

Medizinische Fakultät  
der  
Universität Duisburg-Essen

Aus dem Institut für Pharmakologie

**Wirkungen der Lysophospholipide Sphingosin-1-Phosphat, Lysophosphatidsäure und  
Sphingosylphosphorylcholin auf Nierentubuluszellen des Opossums**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades der Medizin  
durch die Medizinische Fakultät  
der Universität Duisburg-Essen

Vorgelegt von  
Markus Lehmann  
aus Unna

2005

Dekan: Univ.-Prof. Dr. K.-H. Jöckel  
1. Gutachter: Priv.-Doz. Dr. D. Meyer zu Heringdorf  
2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. P. F. Hoyer

**Tag der mündlichen Prüfung: 9. März 2006**

**Publikation****Abstract:**

D. Meyer zu Heringdorf, H. Lass, A. Bischoff, E. Neumann, M. Lehmann, K. H. Jakobs,  
M. C. Michel (2001):

SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE AND SPHINGOSYLPHOSPHORYLCHOLINE  
DIFFERENTIALLY AFFECT *OPOSSUM KIDNEY* CELLS

Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 363 Suppl. R 113

Gewidmet meinen Lehrern, Professoren, Dozenten und  
Ausbildern sowie allen, die bisher Anteil an meiner  
Ausbildung hatten...

... und besonders meinen Eltern.

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1.	Vorkommen und Metabolismus der Lysophospholipide	6
1.2.	Signaltransduktion und zelluläre Wirkungen der Lysophospholipide	7
1.3.	Fragestellung	10
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1.	Material	12
2.1.1.	Lysophospholipide	12
2.1.2.	Biochemikalien und andere Chemikalien	12
2.1.3.	Radiochemikalien	13
2.1.4.	Antikörper	13
2.1.5.	Sonstige Materialien	14
2.2.	Methoden	14
2.2.1.	Zusammensetzung der häufig verwendeten Pufferlösung HBSS	14
2.2.2.	Zellkultur	14
2.2.3.	Pertussistoxin-Behandlung	15
2.2.4.	Messung der intrazellulären Calciumkonzentration	15
2.2.5.	Messung der cAMP-Bildung	16
2.2.6.	Proteinbestimmung nach Lowry	17
2.2.7.	Proteinbestimmung nach Pierce	18
2.2.8.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunblot-Analyse	18
2.2.9.	Bestimmung des Zellwachstums mittels Kristallviolett-färbung	20
2.2.10.	Bestimmung des Thymidineinbaus	20
2.2.11.	Messung der Aktivierung von MAP-Kinasen	21
2.2.12.	Präsentation und Analyse der Messwerte	21
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>22</b>
3.1.	Stimulation von intrazellulären Calciumanstiegen durch Lysophospholipide	22
3.2.	Einfluss der Lysophospholipide auf die cAMP-Bildung	28
3.3.	Einfluss der Lysophospholipide auf das Zellwachstum	30
3.4.	Aktivierung von MAP-Kinasen durch Lysophospholipide	34

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>41</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>Abkürzungen</b>	<b>53</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>55</b>

## 1. Einleitung

Lysophospholipide sind bioaktive Lipide, die an vielen physiologischen und pathophysiologischen Abläufen in zahlreichen Zelltypen und Geweben beteiligt sind. Aufgrund ihrer Grundstruktur werden zwei Untergruppen von Lysophospholipiden unterschieden. Die eine Gruppe wird von Molekülen mit Sphingoidbasen-Grundgerüst gebildet (Lysosphingolipide), die andere Gruppe besteht aus Molekülen mit Glycerol-Grundgerüst (Lysoglycerophospholipide). Durch die Lysolipidstruktur sind diese Moleküle besser wasserlöslich und daher beweglicher als ihre membrangebundenen Vorstufen, aus denen sie gebildet werden (Meyer zu Heringdorf, 2004). In dieser Arbeit werden im Wesentlichen die Wirkungen der Lysophospholipide Lysophosphatidsäure (LPA), Sphingosin-1-Phosphat (S1P) und Sphingosylphosphorylcholin (SPC) behandelt.

### 1.1. Vorkommen und Metabolismus der Lysophospholipide

#### - S1P

S1P wird von der Sphingosinkinase aus Sphingosin gebildet. Es wird in Blutplättchen gespeichert und nach deren Aktivierung in die Blutbahn freigesetzt (Pyne und Pyne, 2000), wo es im Serum in höheren Konzentrationen (ca. 0,5-0,8  $\mu\text{M}$ ) vorkommt als im Plasma (ca. 0,2-0,4  $\mu\text{M}$ ) (Okajima, 2002). Im Plasma ist S1P an Albumin und Lipoproteine, hauptsächlich Lipoproteine hoher Dichte (HDL) gebunden (Okajima, 2002), welche eventuell die Bioverfügbarkeit von S1P im Plasma regulieren könnten (Okajima, 2002). S1P-Abbau findet entweder durch Spaltung zu Hexadecenal und Phosphoethanolamin durch die S1P-Lyase, oder durch Dephosphorylierung zu Sphingosin statt (Pyne und Pyne, 2000; Spiegel und Milstien, 2003).

#### - LPA

LPA ist ebenfalls Bestandteil von Plasma und liegt dort an Albumin gebunden vor (Moolenaar *et al.*, 1997). Es kann sowohl intra- als auch extrazellulär über verschiedene Wege entstehen (Aoki, 2004). Auch für LPA sind Blutplättchen die Hauptquelle (Moolenaar *et al.*, 1997). Extrazelluläres LPA wird aus anderen Lysoglycerophospholipiden durch die Lysophospholipase D gebildet (Moolenaar, 1999). Der Abbau erfolgt hauptsächlich durch

Lipidphosphat-Phosphohydrolasen, die unspezifisch auch S1P abbauen. Als Produkte der Blutgerinnungskaskade spielen LPA und S1P vermutlich in Wechselwirkung mit weiteren Mediatoren wichtige Rollen in der Wundheilung durch Stimulation der Zellmigration und Proliferation (Moolenaar, 1999).

## **- SPC**

In jüngerer Vergangenheit erlangte man vermehrt neue Erkenntnisse über das Lysophospholipid SPC. SPC wurde in verschiedenen Geweben, Plasma und Aszitesflüssigkeit nachgewiesen (Xu *et al.* 2000; Xiao *et al.* 2001). Über die Bildung von SPC ist nur wenig bekannt. Vermutlich wird es durch eine Sphingomyelindeacylase gebildet (zur Übersicht siehe Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2002). Durch das Exoenzym Autotaxin wird SPC zu S1P abgebaut (Clair *et al.*, 2003). SPC-Spiegel sind im Serum (130 nM) höher als im Plasma (50 nM) (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2002), was nahe legt, dass SPC wie S1P und LPA während der Blutgerinnung gebildet wird. In Aszitesflüssigkeit bei Patientinnen mit Ovarialkarzinom wurden signifikant höhere SPC-Spiegel gefunden als in Aszites bei gutartigen Erkrankungen (Übersicht in Meyer zu Heringdorf, 2002), was auf eine pathophysiologische Bedeutung schliessen lässt.

## **1.2. Signaltransduktion und zelluläre Wirkungen der Lysophospholipide**

S1P und LPA fungieren als Signalmoleküle und sind Agonisten an G-Protein-gekoppelten Zelloberflächenrezeptoren der EDG-Familie (für *endothelial differentiation gene*) (Pyne und Pyne, 2000; Spiegel und Milstien, 2000; Hla, 2003; Ishii *et al.*, 2004; Taha *et al.*, 2004). EDG-Rezeptoren haben eine Homologie (ungefähr 30 % Aminosäuresequenzhomologie) zu den Cannabinoid-Rezeptoren, deren Liganden Arachidonsäurederivate sind (Lynch und Im, 1999). Die S1P- und LPA-EDG-Rezeptoren sind über verschiedene G-Proteine an multiple Effektorsysteme wie zum Beispiel Adenylylzyklase, Phospholipase C und D, kleine GTPasen wie Rho und Rac, Tyrosinkinasen und andere gekoppelt (Pyne und Pyne, 2000; Siehler und Manning, 2002; Ishii *et al.*, 2004). Tabelle 1 zeigt die heute verwendete Nomenklatur, nach der die Rezeptoren in der Reihenfolge ihrer Entdeckung und nach ihren Agonisten bezeichnet werden (Chun *et al.*, 2002).



Rezeptor	Synonym	Agonisten
S1P <sub>1</sub>	EDG-1	S1P (nM) Dihydro-S1P (nM) SPC (μM)
S1P <sub>2</sub>	EDG-5	
S1P <sub>3</sub>	EDG-3	
S1P <sub>4</sub>	EDG-6	
S1P <sub>5</sub>	EDG-8	
LPA <sub>1</sub>	EDG-2	LPA (nM)
LPA <sub>2</sub>	EDG-4	
LPA <sub>3</sub>	EDG-7	
LPA <sub>4</sub>	GPR23	
	OGR1	SPC (nM)
	GPR3	S1P
	GPR6	S1P
	GPR12	S1P, SPC

**Tabelle 1: Lysophospholipidrezeptoren und ihre Agonisten. ORG1, GPR3, GPR6 und GPR12 sind bisher relativ schlecht charakterisiert (zur Übersicht siehe Ishii et al., 2004).**

Während die Lysophospholipid-Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> ubiquitär exprimiert werden, kommt S1P<sub>4</sub> hauptsächlich im hämatopoetischen System und im Immunsystem vor, und S1P<sub>5</sub> wird überwiegend im Gehirn exprimiert (zur Übersicht siehe Anliker und Chun, 2004; Ishii *et al.*, 2004). Der LPA<sub>1</sub>-Rezeptor wurde ursprünglich aus zerebralen kortikalen Neuroblasten kloniert (Fukushima *et al.*, 2001). Er wird weitverbreitet auch ausserhalb des Nervensystems exprimiert. Auch LPA<sub>2</sub> und LPA<sub>3</sub> werden ubiquitär exprimiert, während LPA<sub>4</sub> am stärksten im Ovar exprimiert wird (Ishii *et al.*, 2004). Die LPA-Rezeptoren wurden in verschiedenen Tumorzelllinien nachgewiesen (Ishii *et al.*, 2004). Wesentliche Informationen über die jeweilige physiologische Rolle der EDG-Rezeptoren wurden in jüngeren Studien durch gezielte Ausschaltung der Rezeptorgene in Mäusen gewonnen (Übersicht in Anliker und Chun, 2004; Ishii *et al.*, 2004). Die Ausschaltung des LPA<sub>1</sub>-Rezeptors in Mäusen verursachte eine ca. 50 %ige neonatale Letalität. Die überlebenden Mäuse hatten kraniofaziale

Dysmorphien, wiesen ein herabgesetztes Säugeverhalten auf und hatten eine verminderte Körpergrösse (Yang *et al.*, 2002). Die Ausschaltung des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors führte zu Hämorrhagien und Tod während der Embryogenese aufgrund einer defekten Blutgefässreifung, was auf die Rolle des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors bei diesem Vorgang hinweist (Yang *et al.*, 2002). Verschiedene weitere Hinweise erhärten die Beteiligung von S1P-vermittelten Signalwegen bei der Angiogenese. S1P induziert Proliferation und Migration von Gefässendothelzellen (Paik *et al.*, 2001). Dieser Einfluss wird offensichtlich über S1P<sub>1</sub>- und S1P<sub>3</sub>-Rezeptoren vermittelt, deren Rezeptortranskripte in embryonalen Blutgefässen nachgewiesen wurden (Ishii *et al.*, 2004; Paik *et al.*, 2001). Einen Hinweis auf die physiologische Rolle des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors während der Herzentwicklung gibt eine Mutation des S1P<sub>2</sub>-Rezeptorgens im Zebrafisch, genannt „*miles apart*“. Diese Mutation bewirkt die Entwicklung von zwei separaten Herzen im Zebrafisch aufgrund defizitärer Migration der Kardiomyoblasten während der Organogenese (Kupferman *et al.*, 2000). Immunzellen, wie T- und B-Lymphozyten und Makrophagen exprimieren verschiedene Lysophospholipid-Rezeptoren, wobei das Expressionsschema durch Zellaktivierung verändert werden kann (Ishii *et al.*, 2004). Eine therapeutische Bedeutung kommt der Entdeckung des Sphingosin-Analogons FTY720 zu. FTY720 wird durch die Sphingosinkinase phosphoryliert und ist in phosphorylierter Form (FTY720-Phosphat) ein hochpotenter Agonist an S1P-Rezeptoren, mit Ausnahme des S1P<sub>2</sub>-Rezeptors (Brinkmann *et al.*, 2002; Mandala *et al.*, 2002). Die Wirkung von FTY720 *in vivo* kommt jedoch wahrscheinlich durch selektive Herabregulation des S1P<sub>1</sub>-Rezeptors durch nicht-phosphoryliertes FTY720 zustande (Graeler und Goetzl, 2004; Matloubian *et al.*, 2004). FTY720 bewirkt eine verminderte Freisetzung von Lymphozyten aus sekundären Lymphknoten, was zu einer Lymphopenie und damit verminderten zellvermittelten Immunantwort führt. FTY720 wird gegenwärtig in der Transplantationsmedizin als Immunsuppressivum erprobt. Diese Wirkung wird primär durch Einfluss auf Lymphozyten-S1P-Rezeptoren ausgeübt, vermutlich durch Hemmung der S1P<sub>1</sub>-vermittelten Chemotaxis (Matloubian *et al.*, 2004). Transiente Bradykardie als unerwünschte Wirkung von FTY720-Phosphat wird vermutlich durch den S1P<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelt, welcher in Mäusen an der Auslösung von Sinusbradykardie beteiligt ist (Sanna *et al.*, 2004).

SPC fungiert als niedrigaffiner Agonist an den S1P-EDG-Rezeptoren; es sind jedoch für SPC verschiedene weitere Rezeptoren beschrieben worden (zur Übersicht siehe Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2002; Ishii *et al.*, 2002). So wurde der OGR1-Rezeptor (*ovarian cancer G protein coupled receptor 1*) als hochaffiner Rezeptor für SPC beschrieben (Xu *et al.*, 2000) und die Rezeptoren GPR4 und G2A als Rezeptoren für SPC und Lysophosphatidylcholin

(Kabarowski *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001). Während die Aktivierung des OGR1-Rezeptors durch SPC von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden konnte (Bektas *et al.*, 2003), ist es sehr umstritten, ob GPR4 und G2A durch SPC und Lysophosphatidylcholin aktiviert werden (Bektas *et al.*, 2003; Murakami *et al.*, 2004; siehe Ishii *et al.*, 2004). Kürzlich wurde die Publikation von Kabarowski *et al.* (2001), die den G2A-Rezeptor betrifft, zurückgezogen (Witte *et al.*, 2005). Rezeptoren einer weiteren Familie G-Protein-gekoppelter Rezeptoren, GPR3, GPR6 und GPR12, werden durch S1P und/oder SPC aktiviert (Uhlenbrock *et al.*, 2002; Ignatov *et al.*, 2003a, 2003b), siehe Tabelle 1.

Unter dem Einfluss der Lysophospholipide kommt es zur Plättchenaggregation, intrazellulärer Calciummobilisierung, Kontraktion glatter Muskelzellen, Tumorzellinvasion und Zellproliferation (Moolenaar, 1999; Pyne und Pyne, 2000; Hla, 2003; Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2002; Anliker und Chun, 2004). In vielen Zellarten beeinflussen die Lysophospholipide Zellmorphologie, Zytoskelett und Motilität (Spiegel und Milstien, 2000; Mills und Moolenaar, 2003). Wie andere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren unterliegen Lysophospholipid-Rezeptoren einer schnellen, ligandeninduzierten Phosphorylierung und Internalisation von der Zelloberfläche (Moolenaar, 1999). Die grosse Vielfalt von Lysophospholipid-sensitiven Zellen und die weite Verbreitung von EDG-Rezeptortranskripten in Embryonal- und Adultgeweben weisen darauf hin, dass Lysophospholipide von vielen Zellen freigesetzt werden, um Zielzellen zu beeinflussen (Moolenaar, 1999).

### 1.3. Fragestellung

Wie zuvor geschildert, rufen bioaktive Lysophospholipide in vielen Zelltypen eine Vielzahl biologischer Antworten hervor und beeinflussen die Funktion verschiedener Organe. Bischoff *et al.* hatten den Nachweis erbracht, dass S1P und SPC bei Ratten *in vitro* und *in vivo* eine Kontraktion renaler Gefäße verursachen und die renale Funktion beeinflussen (Bischoff *et al.*, 2000a, 2000b, 2001). Isolierte renale und mesenteriale Mikrogefäße der Ratte kontrahierten unter dem Einfluss von S1P und SPC konzentrationsabhängig (Bischoff *et al.*, 2000a). *In vivo* verminderten beide Lysophospholipide den renalen sowie mesenterialen Blutfluss (Bischoff *et al.*, 2000b). In der narkotisierten Ratte führte die Infusion von S1P trotz Reduktion des renalen Blutflusses zur Steigerung der Diurese (Bischoff *et al.*, 2001). Infundiertes SPC hatte nur geringfügige Auswirkungen auf den renalen Blutfluss, steigerte aber die Diurese (Bischoff *et al.*, 2001).

Bislang liegen nur wenige Daten über die zellulären Wirkungen der Lysophospholipide an kultivierten Nierenzellen vor. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung von S1P, SPC und LPA auf *Opossum kidney*-Zellen untersucht. Diese Zelllinie wurde aus Nierengewebe des adulten amerikanischen Opossums (*Didelphys virginiana*) gewonnen (Koyama *et al.*, 1978) und stellt ein Modell für proximale epitheliale Nierentubuluszellen dar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Wirkungen der Lysophospholipide auf die intrazelluläre freie Calciumkonzentration ( $[Ca^{2+}]_i$ ), auf die Bildung von cAMP, auf das Zellwachstum und auf die Aktivierung von MAP-Kinasen untersucht.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Lysophospholipide

S1P und SPC wurden in 1 mg/ml fettsäurefreiem Rinderserumalbumin (BSA) in H<sub>2</sub>O verdünnt. LPA wurde in H<sub>2</sub>O gelöst.

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
LPA	Sigma
S1P	Biomol
SPC	Biomol

#### 2.1.2. Biochemikalien und andere Chemikalien

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
Acrylamid	Serva
Ammoniumperoxidsulfat	Serva
Bisacrylamid	Serva
Bromphenolblau	Serva
BSA, fettsäurefrei	Sigma
DMEM	Gibco BRL
Digitonin	Sigma
ECL®-Westernblot-Reagenz	Amersham
EGTA	Merck
FKS	Gibco BRL
Forskolin	Calbiochem
Fura-2/AM	Molecular Probes
Glycin	Sigma
HEPES	Serva
IBMX	Sigma
Kationenaustauscher AG 50W-X4	Biorad

<u>Substanz</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
Kristallviolett	Apotheke Universitätsklinikum Essen
Molekulargewichtsstandard	Sigma
PD 98059	Calbiochem
p38 MAP-Kinase-Inhibitor	Calbiochem
Penicillin/Streptomycin-Lösung	Seromed
Ponceau S	Sigma
Probenecid	Sigma
PTX	List Biological Laboratories
SDS	Sigma
TEMED	Serva
Trichloressigsäure	Merck
Trypsin-EDTA-Lösung	Seromed
Tween® 20	Sigma

### 2.1.3. Radiochemikalien

<u>Substanz</u>	<u>spezifische Aktivität</u>	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
[ <sup>3</sup> H]cAMP	31,5 Ci/mmol	NEN Life Science Products
[ <sup>3</sup> H]Thymidin	6,7 Ci/mmol	NEN Life Science Products

### 2.1.4. Antikörper

	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
anti-Phospho-p38 MAP-Kinase-Antikörper (Kaninchen)	New England BioLabs
anti-Phospho-p42/44 MAP-Kinase-Antikörper (Kaninchen)	Cell Signaling Technology
anti-Phospho-JNK/SAPK MAP-Kinase-Antikörper (Kaninchen)	Cell Signaling Technology
anti-Kaninchen IgG/Peroxidase-Konjugat	Sigma

### 2.1.5. Sonstige Materialien

	<u>Hersteller/Lieferfirma</u>
BCA Protein Assay Kit	Pierce Chemicals
Emulisifier Scintillator Plus/299	Packard
Pasteurpipetten	Brand
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 3,5 ml, 6,5 ml)	Sarstedt
Kodak X-OMAT AR-Filme	Kodak
Kunststoff-Einmalküvetten	Sarstedt
Nitrozellulosefilter	Advanced Microdevices
Szintillationsgefäße	Packard
Zellkulturschalen (Ø 35-, 145 mm)	Greiner
Zentrifugenröhrchen (25 ml, 50 ml)	Greiner

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Zusammensetzung der häufig verwendeten Pufferlösung HBSS:

118 mM NaCl  
 5 mM KCl  
 1 mM CaCl<sub>2</sub>  
 1 mM MgCl<sub>2</sub>  
 5 mM D-Glucose  
 15 mM HEPES  
 pH 7,4

### 2.2.2. Zellkultur

Nierentubuluszellen vom Opossum (*Opossum kidney*-Zellen) wurden in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C kultiviert. Als Nährmedium wurde DMEM/F12 mit 10 % FKS, 100 U/ml Penicillin G und 100 µg/ml Streptomycin eingesetzt. Die Zellkulturarbeiten wurden unter einer sterilen Werkbank (LaminarAir HS 12, Heraeus) vorgenommen. Benötigte Lösungen und Medien wurden sterilfiltriert bzw. bei 121 °C für 30 min autoklaviert. Zellkulturschalen, Pipetten sowie andere für die Zellkultur benötigte Materialien bestanden

aus sterilem Einwegmaterial. Um die Zellen zur Subkultivierung von der Zellkulturschale abzulösen, wurden diese zweimal mit Calcium- und Magnesium-freiem HBSS gewaschen. Nach Vorbehandlung mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,5 g/l Trypsin, 0,2 g/l EDTA) und anschliessendem mehrfachem Aufpipettieren mit frischem Wachstumsmedium zur Ablösung wurden die Zellen auf neues Zellkulturmaterial verteilt.

### **2.2.3. Pertussistoxin-Behandlung**

Um eine Beteiligung von  $G_i$ -Proteinen bei der Signalübermittlung der Lysophospholipid-rezeptoren zu untersuchen, wurden die Zellen mit Pertussistoxin (PTX) vorbehandelt. PTX bewirkt eine ADP-Ribosylierung der  $\alpha$ -Untereinheiten von  $G_i$ -Proteinen, was zur Entkopplung dieser G-Proteine von den Rezeptoren, und damit, je nach Grad der Beteiligung von  $G_i$ -Proteinen an der Signaltransduktion, zu einer Abschwächung oder Aufhebung des rezeptorvermittelten Signals führt. Für die PTX-Behandlung wurde bei subkonfluent gewachsenen *Opossum kidney*-Zellen das vorhandene Medium durch frisches Medium mit 100 ng/ml PTX ersetzt. Bei den Kontrollzellen erfolgte ebenfalls ein Mediumwechsel. Mit den so behandelten Zellen wurden die Messungen nach 16stündiger Inkubation durchgeführt.

### **2.2.4. Messung der intrazellulären Calciumkonzentration**

Die  $[Ca^{2+}]_i$  wurde nach der Methode von Grynkiewicz *et al.* (1985) im Spektrofluorometer (Hitachi F2000) gemessen. Hierfür wurde der Calcium-sensitive Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 verwendet. Die Zellen wurden mit Hilfe von Trypsin abgelöst und in HBSS mit 2 mM Probenecid für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln mit 1  $\mu$ M Fura-2/AM beladen. Fura-2/AM ist zellpermeabel und wird im Zellinneren durch unspezifische Esterasen in impermeables Fura-2 gespalten, das in der Zelle akkumuliert. Der Zusatz von Probenecid verbesserte die Akkumulation von Fura-2 in *Opossum kidney*-Zellen. Überschüssiges Fura-2/AM wurde durch zweimaliges Waschen mit HBSS entfernt und die Zellen anschliessend in HBSS resuspendiert. Die Messungen fanden innerhalb der nächsten Stunde statt. Hierbei wurde die Fluoreszenz einer kontinuierlich gerührten Zellsuspension (2 ml mit ca.  $10^6$  Zellen/ml) bei Raumtemperatur im Spektrofluorometer gemessen. Calcium-gebundenes Fura-2 hat ein Anregungsmaximum bei  $\lambda=340$  nm, die Calcium-freie Form bei  $\lambda=380$  nm. Die Exzitationswellenlänge wechselte alle 500 ms zwischen 340 und 380 nm. Nachdem sich eine stabile Basislinie eingestellt hatte, wurden die Agonisten hinzugefügt. Zur Bestimmung der



maximalen Emission von Calcium-gebundenem Fura-2 wurden die Zellen mit Digitonin (0,03 %) permeabilisiert. Anschliessend wurde das freie Calcium mit EGTA (15 mM) komplexiert und das Emissionsmaximum der Calcium-freien Form ermittelt. Aus den Emissionsverhältnissen wird die  $[Ca^{2+}]_i$  nach der Ratio-Methode mittels folgender Formel berechnet:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d(R_t - R_{min}) / (R_{max} - R_t) F_{min\ 380} / F_{max\ 380}$$

$[Ca^{2+}]_i$	= intrazelluläre Konzentration an freiem Calcium
$K_d$	= 224 nM (Dissoziationskonstante von Fura-2 für Calcium)
$R_t$	= $F_{340}/F_{380}$ zum Zeitpunkt t
$R_{max}$	= $F_{340\ max}/F_{380\ max}$ bei maximaler $[Ca^{2+}]_i$
$R_{min}$	= $F_{340\ min}/F_{380\ min}$ bei minimaler $[Ca^{2+}]_i$
$F_{max\ 380}$	= Emission nach Anregung bei $\lambda=380$ nm und bei maximaler $[Ca^{2+}]_i$
$F_{min\ 380}$	= Emission nach Anregung bei $\lambda=380$ nm und bei minimaler $[Ca^{2+}]_i$

### 2.2.5. Messung der cAMP-Bildung

cAMP wird von der Adenylylzyklase aus ATP gebildet und fungiert als *second messenger*. Veränderungen der Aktivität der Adenylylzyklase führen zu veränderten intrazellulären Konzentrationen von cAMP. Die intrazelluläre cAMP-Menge wurde mit einem Bindungsassay bestimmt. Hierbei wurde die Bindung von  $[^3H]$ cAMP an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) bestimmt. Auf 60-mm Kulturschalen gewachsene, subkonfluente *Opossum kidney*-Zellen wurden mit HBSS gewaschen und für 30 min bei 37 °C in HBSS mit 1 mM des Phosphodiesteraseinhibitors IBMX vorbehandelt, wodurch der Abbau von cAMP gehemmt wurde. Anschliessend folgte eine fünfminütige Behandlung mit den Agonisten in Anwesenheit von IBMX bei 37 °C. Um sowohl eine Stimulation als auch eine Hemmung der Adenylylzyklase feststellen zu können, wurden die Ansätze sowohl ohne als auch mit 100 nM bzw. 100  $\mu$ M Forskolin, einem direkten Stimulator der Adenylylzyklase, durchgeführt. Durch den Austausch des Puffers gegen 2 ml 5 %ige, eiskalte Trichloressigsäure wurde die Reaktion gestoppt. Die Zellen wurden in der Trichloressigsäure von den Schalen abgelöst und anschliessend für 30 min bei 1500 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden für die Proteinbestimmung nach Lowry verwendet, die Überstände wurden durch

Ionenaustauschchromatographie gereinigt. Dazu wurden kleine Glassäulen mit je 1 ml des Kationenaustauschers AG 50W-X4 beschickt und durch folgenden Modus regeneriert: 2 x 5 ml 0,5 N NaOH, 2 x 5 ml H<sub>2</sub>O, 2 x 5 ml 1 N HCl und 6 x 5 ml H<sub>2</sub>O. Zur Bestimmung der Wiederfindungsrate des cAMP nach der Säulenchromatographie wurde zu jedem Überstand 10000 cpm [<sup>3</sup>H]cAMP gegeben. Nach Auftragen der Proben auf die Säulen wurden diese zunächst mit 3 ml H<sub>2</sub>O gespült. Anschliessend wurden die Proben mit 4 ml H<sub>2</sub>O eluiert. Von den Eluaten wurden jeweils 750 µl in Szintillationsgefässe pipettiert, mit Szintillationslösung gemischt und die Radioaktivität bestimmt, um die Wiederauffindungsrate des cAMP feststellen zu können, welche bei 40-60 % lag. Die Wiederauffindungsrate einer jeweiligen Probe wurde in die spätere Berechnung des cAMP-Gehaltes mit einbezogen. Für den PKA-Bindungsversuch wurde [<sup>3</sup>H]cAMP in einer Konzentration von 1 µCi/ml in 0,5 M Natriumacetat, 2 % BSA (5:1) angesetzt. Jeweils 160 µl von den Säuleneluaten wurden mit 30 µl [<sup>3</sup>H]cAMP-Lösung (ca. 1 pmol cAMP) in Röhrchen auf Eis vorgelegt. Indem anstelle des Säuleneluates aufsteigende Mengen von unmarkiertem cAMP (0,1 pmol bis 1,5 pmol) in die Röhrchen gegeben wurden, wurde eine Standardkurve erstellt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 µl (5 µg) der regulatorischen PKA-Untereinheit gestartet. Die Reaktion wurde nach 2 – 3 h Inkubation auf Eis durch Zugabe von 3 ml eiskaltem Kaliumphosphat-Puffer (20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 6,0) und rascher Filtration über Nitrocellulosefilter gestoppt, die Filter wurden dreimal mit 3 – 4 ml Kaliumphosphat-Puffer gewaschen und in 1 ml 2-Methoxyethanol gelöst. Nach Zugabe von Szintillationslösung wurde die Radioaktivität auf den Filtern bestimmt.

### **2.2.6. Proteinbestimmung nach Lowry**

Die Proteinbestimmung im Rahmen der cAMP-Messung erfolgte nach dem von Lowry *et al.* (1951) entwickelten Verfahren. Als Proteinstandard für die Standardkurve wurde 1 mg/ml BSA verwendet. In Doppelwerten wurden je 0, 10, 30, 50, 70 und 100 µl BSA in Küvetten pipettiert und dann mit 1 N NaOH auf 100 µl aufgefüllt. Die Proteinstandards und die Proben wurden nach Zugabe von je 1 ml Proben-Lösung und 0,5 ml 1 % CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O-Lösung für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hinzufügen von 100 µl Folin-Phenolreagenz, das 1:1 mit H<sub>2</sub>O verdünnt worden war, wurden die Röhrchen gemischt und bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Schliesslich wurde in einem Spektrophotometer die Absorption bei 750 nm gemessen. Aus den Werten für die Standardreihe wurde eine Eichkurve erstellt und hiermit die Proteinkonzentration der Proben errechnet.

### 2.2.7. Proteinbestimmung nach Pierce

Bei der Messung der MAP-Kinase-Aktivierung erfolgte die quantitative Proteinbestimmung mit dem *BCA Protein Assay Kit* von Pierce Chemicals. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde mit der Albumin Standard-Lösung der Konzentration 2 mg/ml in H<sub>2</sub>O eine Verdünnungsreihe mit 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,2 mg/ml und 0,1 mg/ml hergestellt. Von jeder Standardlösung wurden Zweifachbestimmungen durchgeführt, um Doppelwerte zu erhalten. Je 10 µl Standardlösung aus der Verdünnungsreihe wurden in Küvetten pipettiert und 40 µl H<sub>2</sub>O zugefügt. Von den Probe-Lysaten wurde pro Probe zum einen 5 µl Lysat mit 45 µl H<sub>2</sub>O und zum anderen 10 µl Lysat mit 40 µl H<sub>2</sub>O in Küvetten pipettiert. Durch diese Bestimmung mit zwei Proteinkonzentrationen sollte eine Fehlbestimmung durch zu hohe Proteinmengen vermieden werden. Von den Probe-Lysaten wurden ebenfalls Zweifachbestimmungen durchgeführt. In alle Küvetten wurden jeweils 1 ml Reagenz A und 20 µl Reagenz B zugefügt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschliessend wurde die Absorption bei 562 nm im Photometer gemessen und aus den Standards eine Eichkurve erstellt, mit deren Hilfe die Proteinmenge der Proben berechnet werden konnte.

### 2.2.8. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunblot-Analyse

Die ca. 9 cm langen Gele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese hatten einen Acrylamidanteil von 10 %. Acrylamid und Bisacrylamid standen zueinander im Verhältnis von 30:0,8 und wurden mittels Ammoniumperoxidsulfat und TEMED polymerisiert. Das Probelysat wurde mit Laemmli-Puffer für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. Der zur Orientierung eingesetzte Molekulargewichtsstandard war folgendermassen zusammengesetzt: Myosin (205 kDa), β-Galaktosidase (116 kDa), Phosphorylase b (97,4 kDa), BSA (66 kDa), Ovalbumin (45 kDa) und Carboanhydrase (29 kDa), und wurde auf dieselbe Art mit Laemmli-Puffer vorbereitet. Jede Tasche des Laufgels wurde mit ca. 50 µg Protein beladen, die Elektrophorese dann mit 36 mA für 4 h durchgeführt. Nach der Auftrennung der Proteine wurden diese aus dem Polyacrylamidgel bei ca. 4 °C mit einer Gesamtladungsmenge von ca. 2000 mAh in Blotpuffer auf Nitrozellulosemembranen überführt. Die übertragenen Proteine wurden mit Ponceau S-Lösung angefärbt und die Standardproteine markiert. Die Nitrozellulosemembranen wurden bei Raumtemperatur für eine Stunde mit 5 % Milchpulver (w/v) in TBS behandelt, um Bindungsstellen unspezifisch abzusättigen. Danach wurden die Membranen zweimal mit TBS gewaschen und mit Antikörpern (anti-Phospho-p42/44 MAP-

Kinase-Antikörper, anti-Phospho-p38 MAP-Kinase-Antikörper bzw. anti-Phospho-JNK/SAPK MAP-Kinase-Antikörper, aus dem Kaninchen) bei 4 °C über Nacht inkubiert. Die Antikörper wurden 1:1000 in TBS mit 0,2 % BSA (m/v) verdünnt. Die Membranen wurden dann erneut zweimal mit TBS gespült und bei Raumtemperatur für 1 h mit 5 % Milchpulver inkubiert. Nach zweimaliger Spülung mit TBS wurde anschliessend 1 h mit dem zweiten Antikörper (Anti-Kaninchen-Peroxidase-Antikörper) verdünnt in TBS mit 0,2 % BSA 1:5000, inkubiert. Die Nitrozellulosemembran wurde schliesslich folgendermassen gewaschen: zweimal mit TBS, dreimal mit TBS plus 0,2 % Tween® 20 (v/v), einmal mit TBS. Dann wurden die Membranen mit einem Gemisch von je 3 ml ECL®-Reagenz 1 und 2 für 1 min inkubiert. Die Proteinbanden wurden durch ca. 30sekündige Exposition der Membranen auf Kodak X-Omat-Filmen sichtbar gemacht.

Laemmli-Puffer 3x:	6,6 g SDS 20 ml $\beta$ -Mercaptoethanol 20 ml Tris 1 M 100 mg Bromphenolblau (Brilliant Blue R-25 <sup>G</sup> ) pH 7,5, dann Zugabe von 33 ml Glycerol H <sub>2</sub> O ad 100 ml
Laufpuffer:	1 % SDS (m/v) 200 nM Glycin 25 nM Tris
Trenngelpuffer 2x:	0,2 % SDS (m/v) 750 nM Tris-HCl pH 8,8
Sammelgelpuffer 2x:	0,2 % SDS (m/v) 250 nM Tris-HCL pH 6,8
TBS:	150 mM NaCl 10 mM Tris-HCl pH 7,3

Blotpuffer:                    20 % Methanol (v/v)  
                                   0,01 % SDS (m/v)  
                                   300 mM Glycin  
                                   40 mM Tris

Ponceau S-Lösung:            5 % Essigsäure (v/v)  
                                   0,1 % Ponceau S (m/v)

### **2.2.9. Bestimmung des Zellwachstums mittels Kristallviolettffärbung**

*Opossum kidney*-Zellen wurden mit einer Dichte von 10 000 Zellen/ml auf 24-Lochplatten ausgesät. Nach Anheftung der Zellen wurde das Zellmedium entfernt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen wurden die Zellen für 24 h in serumfreiem Medium gehalten. Anschliessend wurden die Zellen nach Zugabe der Agonisten in serumfreiem Medium zwei bzw. drei Tage inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen mit HBSS gewaschen. Die zelluläre DNA wurde durch Zugabe von 0,5 % Kristallviolett in Methanol/H<sub>2</sub>O (1/4) für 15 min bei Raumtemperatur angefärbt. Dann wurden die Zellen fünfmal mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach Zellyse mit 33 %iger Essigsäure wurde die Absorption im Photometer bei 595 nm gegen 33 %ige Essigsäure gemessen.

### **2.2.10 Bestimmung des Thymidineinbaus**

Als Index für die DNA-Syntheserate infolge agonisteninduzierter Zellproliferation in *Opossum kidney*-Zellen diente die Bestimmung des Einbaus von [<sup>3</sup>H]Thymidin. Die *Opossum kidney*-Zellen wurden auf 24-Lochplatten ausgesät. Nach Anheftung der Zellen wurde das Medium entfernt. Nach zweimaligem Waschen der Zellen wurde das Medium durch jeweils 1 ml serumfreies Medium mit den gelösten Agonisten ersetzt. In jede Vertiefung der 24-Lochplatte wurden jeweils 100 µl [<sup>3</sup>H]Thymidin-Lösung (5 µCi/ml) pipettiert. Nach unterschiedlich langer Inkubation (zwei bzw. drei Tage) im Brutschrank wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit je 1 ml eiskaltem HBSS gewaschen. Im Anschluss wurde jeweils 1 ml eiskalte TCA für 10 min in jede Vertiefung gegeben, dann nochmals mit je 1 ml eiskalter TCA gewaschen. Die Zellen wurden mit 0,5 M NaOH für 10 min bei Raumtemperatur abgelöst und das Lysat in Szintillationsgefässen gegeben. Anschliessend

wurde die Radioaktivität des Lysates im Szintillationszähler (Beckmann LS 6000 SC) bestimmt.

#### **2.2.11. Messung der Aktivierung von MAP-Kinasen**

*Opossum kidney*-Zellen wurden auf 35 mm-Schälchen ausgesät. Nach Anheftung der Zellen wurden diese zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen und für zwei Tage in serumfreiem Medium kultiviert. Zwei Schälchen wurden für die Proteinbestimmung nach Pierce verwendet und dafür zweimal mit HBSS gewaschen und anschliessend mit 1 ml 0,1 N NaOH abgelöst. Die übrigen Schälchen wurden je zweimal mit 1 ml HBSS gewaschen und für 30 min auf eine Wärmeplatte (37 °C) gestellt. Nach Entfernung des HBSS wurde jeweils 1 ml Stimulationslösung auf die Zellen gegeben. Die Inkubation wurde nach 5 min mit 500 µl Lysepuffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 1 % SDS) gestoppt. Die Proteine wurden anschliessend durch SDS-PAGE in 10 % Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Nach dem Blotting auf Nitrozellulose wurden die phosphorylierten MAP-Kinasen durch phospho-spezifische Antikörper und einen Peroxidase-konjugierten zweiten Antikörper markiert. Die Immunreaktion wurde durch Chemilumineszenz mittels ECL®-Reagenz sichtbar gemacht, wie oben (3.2.8.) beschrieben.

#### **2.2.12. Präsentation und Analyse der Messwerte**

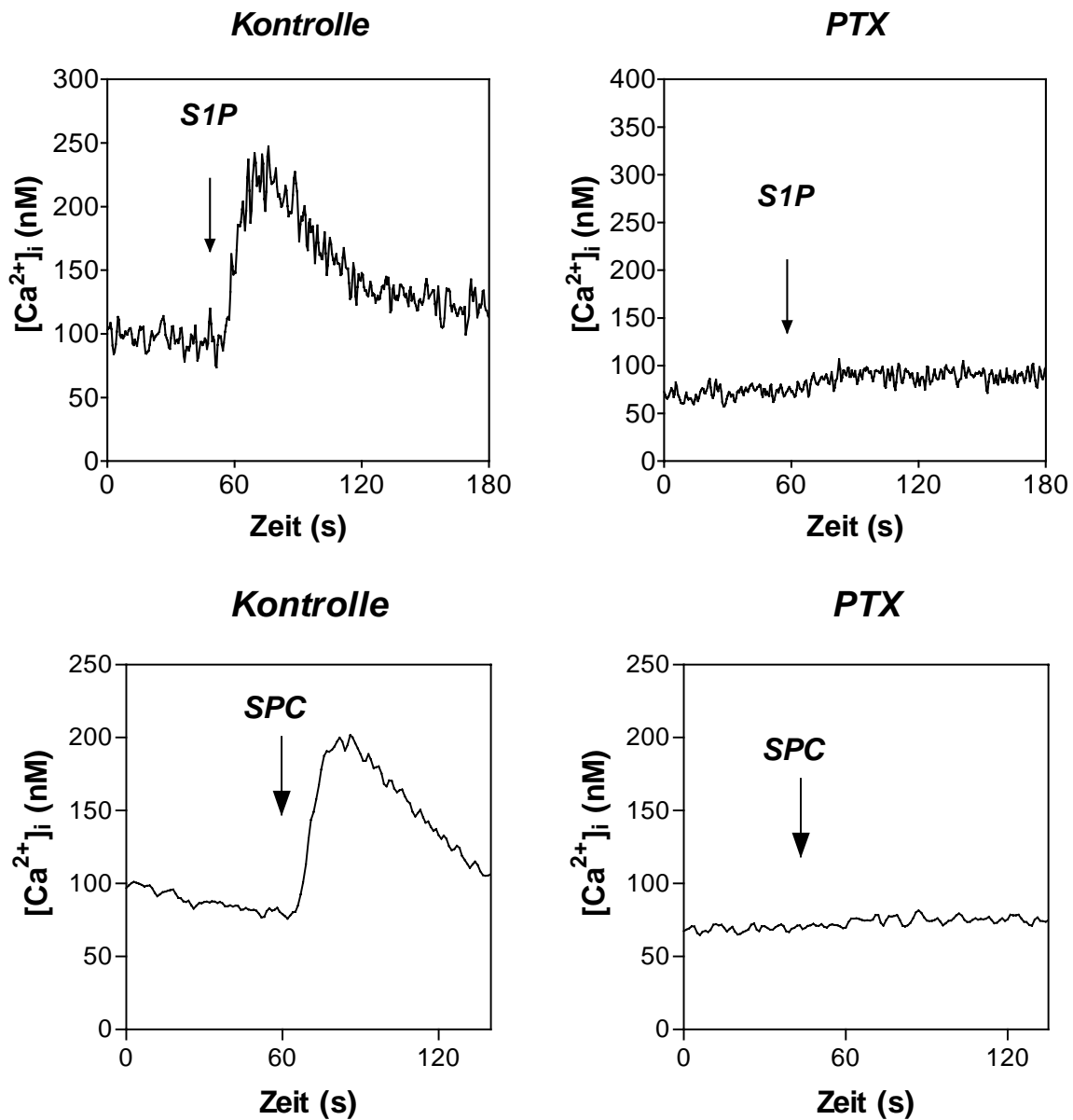
Die Messwerte sind entweder als Mittelwerte  $\pm$  SEM einer Anzahl von unabhängigen Experimenten oder als Mittelwerte  $\pm$  SD der Mehrfachbestimmungen eines repräsentativen Experiments dargestellt. Die Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden durch die Anpassung sigmoidaler Funktionen an die Messwerte analysiert. Hierbei wurde die nicht-lineare Regressionsanalyse des Programms GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego CA, USA) angewendet, womit auch die EC<sub>50</sub>-Werte berechnet wurden. GraphPad Prism wurde auch zur statistischen Analyse der Messwerte eingesetzt. Die jeweils angewandten Testverfahren sind in den Abbildungslegenden angegeben.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Stimulation von Anstiegen der intrazellulären Calciumkonzentration durch Lysophospholipide

Eine Wirkung vieler G-Protein-gekoppelter Rezeptoren ist die Stimulation von Anstiegen der  $[Ca^{2+}]_i$ , was einen entscheidenden Einfluss auf eine grosse Zahl zellulärer Prozesse hat. In einer Vielzahl von Zelltypen stimuliert die extrazelluläre Zugabe von S1P, SPC und LPA einen Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$ . Auch an *Opossum kidney*-Zellen konnte nach extrazellulärer Zugabe von S1P ein rascher, transients Anstieg der  $[Ca^{2+}]_i$  beobachtet werden. Nach ca. 30 s erreichte die  $[Ca^{2+}]_i$  ein Maximum, dem eine Plateauphase folgte (Abb. 1). Ähnliche Anstiege der  $[Ca^{2+}]_i$  liessen sich nach Stimulation mit SPC und LPA (Abb. 1 und 2) beobachten. Die  $EC_{50}$  der Lysophospholipid-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege betrug für S1P  $50 \pm 20$  nM und für SPC  $390 \pm 50$  nM (Abb. 3 und 4). S1P war folglich ungefähr achtmal potenter als SPC. LPA induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege mit einer  $EC_{50}$  von  $20 \pm 6$  nM (Abb. 5).

Um eine mögliche Beteiligung von  $G_i$ -Proteinen an der Vermittlung von  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegen durch S1P, SPC und LPA zu untersuchen, wurden PTX-behandelte Zellen mit den Lysophospholipiden stimuliert. Die Vorbehandlung mit PTX hemmte die durch S1P und SPC induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege nahezu vollständig (Abb. 1). Die durch LPA induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege wurden durch PTX-Vorbehandlung dagegen nur um ca. 40-50 % reduziert (Abb. 2).



**Abbildung 1:  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch S1P und SPC in *Opossum kidney*-Zellen**

Die Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  wurden an *Opossum kidney*-Zellen durchgeführt, welche mit Fura-2 beladen worden waren. Die Zeitverläufe der  $[Ca^{2+}]_i$  in den Kontrollzellen sind den  $[Ca^{2+}]_i$ -Verläufen in den PTX-behandelten Zellen (100 ng/ml PTX für 16 h) gegenüber gestellt. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Agonistenapplikation. Es wurde mit 1  $\mu$ M S1P (f. c.) und 10  $\mu$ M (f. c.) SPC stimuliert.



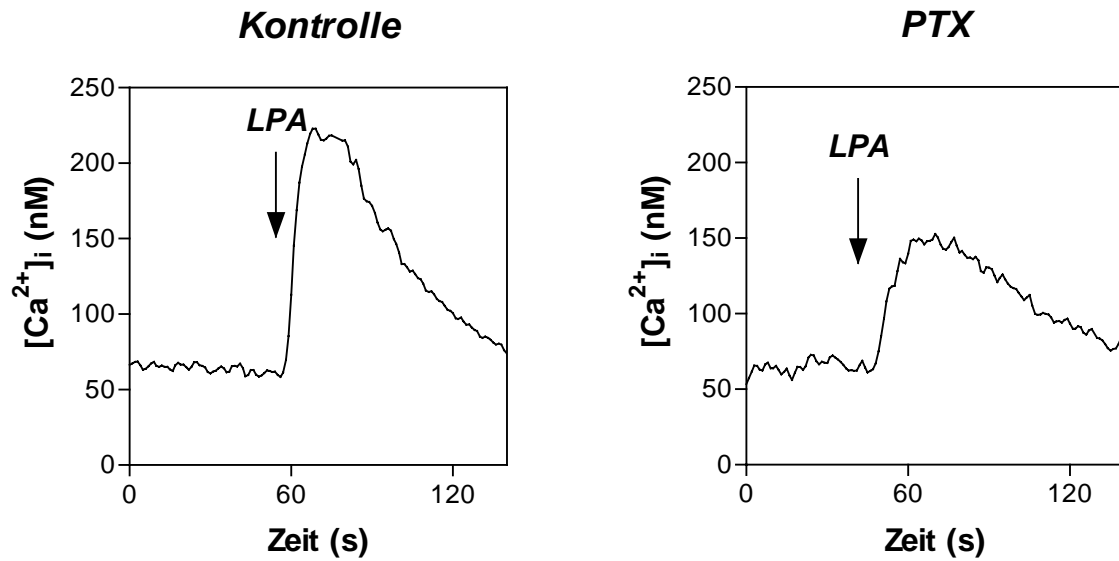


Abbildung 2:  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch LPA in *Opossum kidney*-Zellen

Die Messungen der  $[Ca^{2+}]_i$  wurden an mit Fura-2 beladenen *Opossum kidney*-Zellen durchgeführt. Der Zeitverlauf der  $[Ca^{2+}]_i$  in den Kontrollzellen ist dem  $[Ca^{2+}]_i$ -Verlauf in den PTX-behandelten Zellen (100 ng/ml PTX für 16 h) gegenüber gestellt. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt der Agonistenapplikation. Es wurde mit 10  $\mu$ M LPA (f. c.) stimuliert.

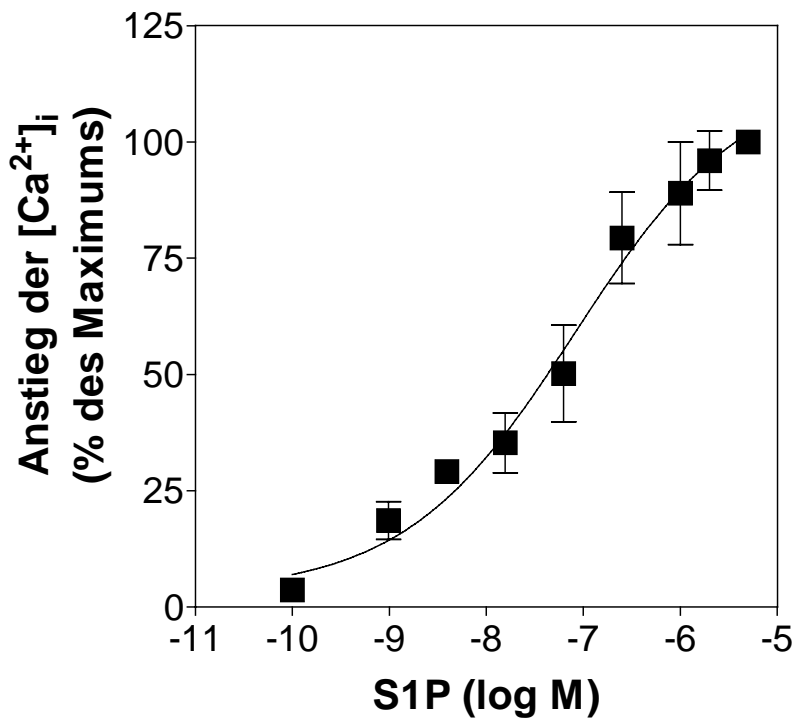
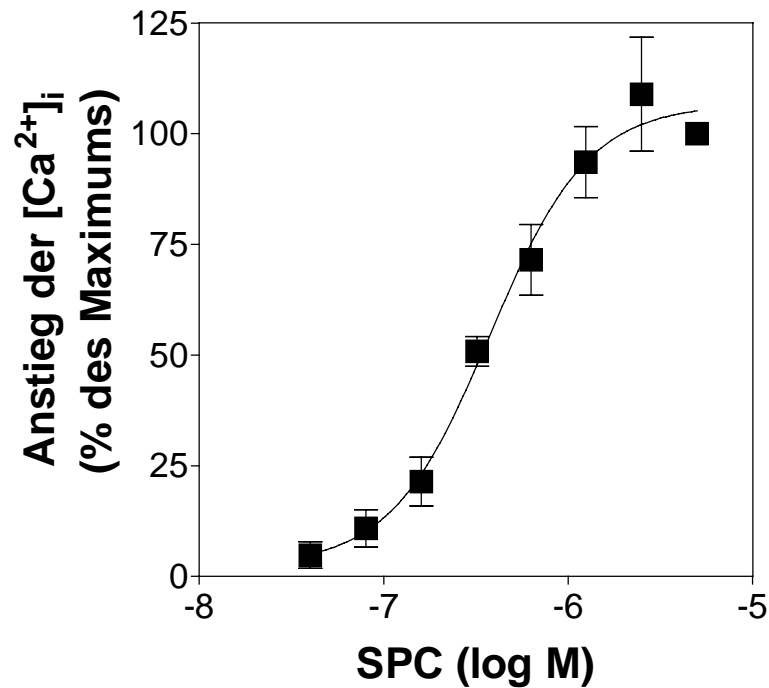


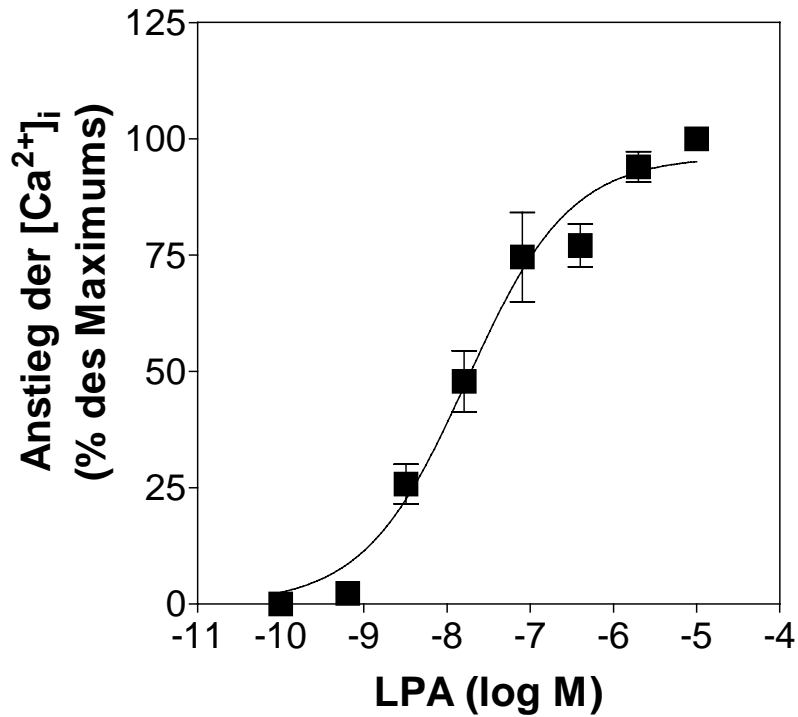
Abbildung 3: **Konzentrations-Wirkungs-Kurve der S1P-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in *Opossum kidney*-Zellen**

Es wurde mit den angegebenen Konzentrationen von S1P stimuliert und der maximale  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei Experimenten in % des maximalen  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs angegeben.



**Abbildung 4:** Konzentrations-Wirkungs-Kurve der SPC-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$  -Anstiege in *Opossum kidney*-Zellen

Es wurde mit den angegebenen Konzentrationen von SPC stimuliert und der maximale  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstieg gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei Experimenten in % des maximalen  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiegs angegeben.

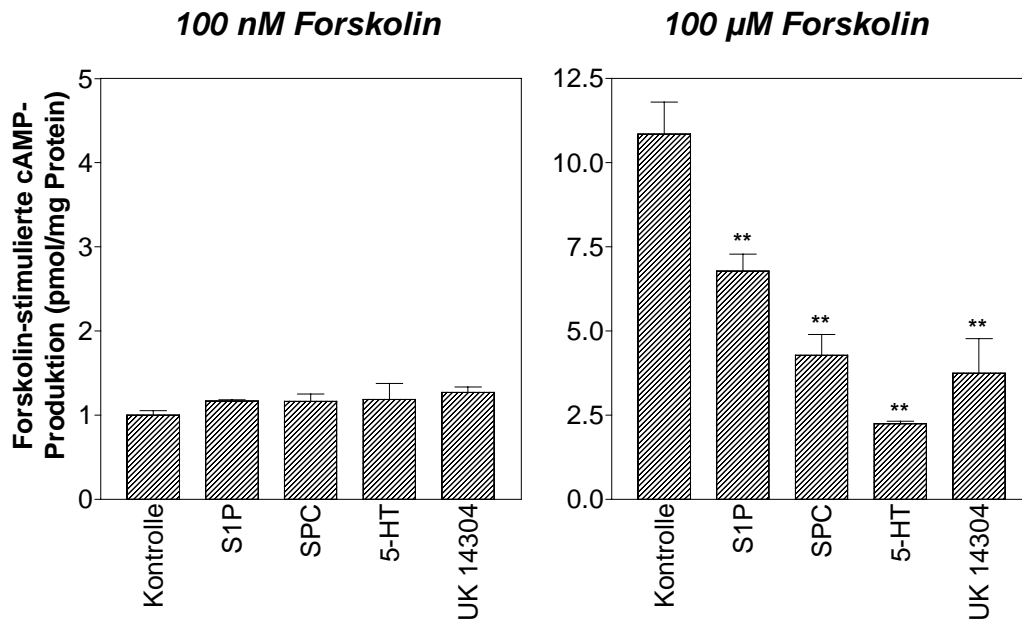


**Abbildung 5: Konzentrations-Wirkungs-Kurve der LPA-induzierten [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> -Anstiege in *Opossum kidney*-Zellen**

Es wurde mit den angegebenen Konzentrationen von LPA stimuliert und der maximale [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstieg gemessen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM aus vier Experimenten in % des maximalen [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Anstiegs angegeben.

### 3.2. Einfluss der Lysophospholipide auf die cAMP-Bildung

Viele extrazelluläre Botenstoffe bewirken durch Beeinflussung der Adenylylzyklase-Aktivität veränderte intrazelluläre Spiegel des *second messengers* cAMP, der seinerseits weitere Effektorsysteme in den Zielzellen beeinflusst. Abb. 6 zeigt den Einfluss von S1P und SPC auf die Forskolin-stimulierte cAMP-Bildung. Da *Opossum kidney*-Zellen  $\alpha_{2C}$ - sowie  $\beta_1$ - und auch 5-HT<sub>1B</sub>-Rezeptoren exprimieren (Kribben *et al.*, 1997; Zgombick *et al.*, 1998), wurde neben den beiden Lysophospholipiden auch die Wirkung von Serotonin (5-HT) und UK14304, einem selektivem  $\alpha_2$ -Agonisten, mituntersucht. Zunächst wurde untersucht, ob die Lysophospholipide eine Stimulation der cAMP-Bildung verursachten. Hierzu wurde die Adenylylzyklase mit 100 nM Forskolin sehr schwach vorstimuliert, um geringe Effekte der Lysophospholipide besser feststellen zu können. Weder S1P noch SPC stimulierten unter diesen Bedingungen die cAMP-Bildung. Als nächstes wurde untersucht, ob S1P und SPC in *Opossum kidney*-Zellen eine Hemmung der cAMP-Produktion induzierten. Für einige S1P- und LPA-Rezeptoren (S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>5</sub> sowie LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub>) ist eine Hemmung der Adenylylzyklase beschrieben worden (Ishii *et al.*, 2004). Auch in HEK293-Zellen hemmte S1P die Forskolin-stimulierte cAMP-Produktion (van Koppen *et al.*, 1996). Die Adenylylzyklase wurde mit 100  $\mu$ M Forskolin vorstimuliert. Hierdurch stieg die cAMP-Bildung im Vergleich zur Behandlung mit 100 nM Forskolin um etwa das 10fache. Wie bereits an *Opossum kidney*-Zellen beschrieben (Kribben *et al.*, 1997), hemmten 5-HT und UK14304 unter diesen Bedingungen die cAMP-Produktion (Abb. 6). Auch S1P (5  $\mu$ M) und SPC (10  $\mu$ M) hemmten effektiv die cAMP-Bildung (Abb. 6).



**Abbildung 6: Einfluss von S1P und SPC auf die cAMP-Produktion**

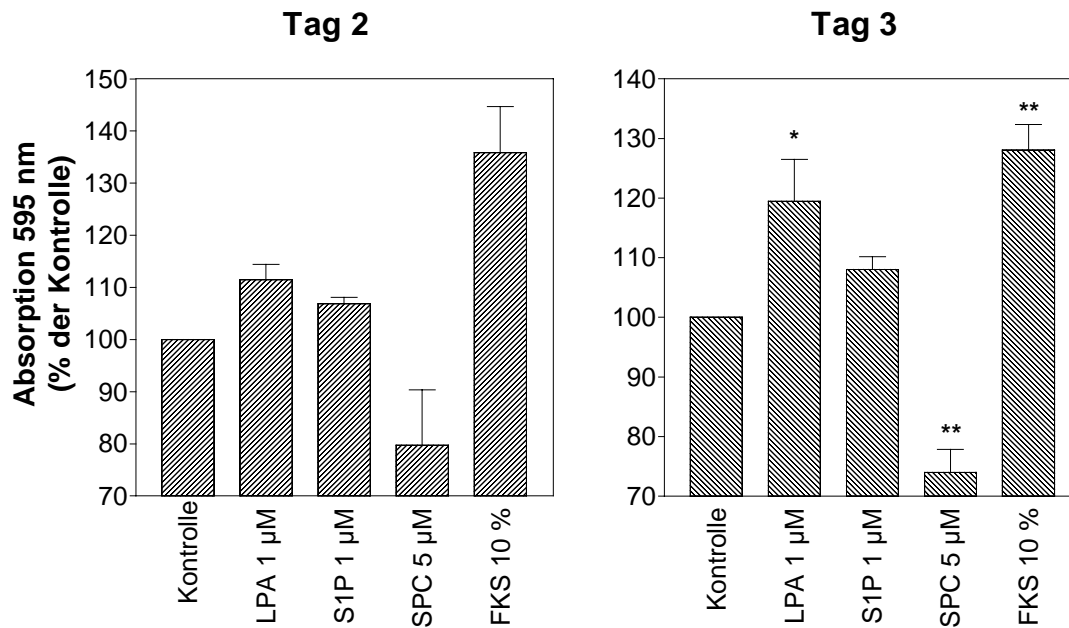
Die cAMP-Bildung wurde in *Opossum kidney*-Zellen nach 30minütiger Vorbehandlung mit 1 mM IBMX und Inkubation für 5 min bei 37 °C mit den angegebenen Agonisten (S1P 5 µM, SPC 10 µM, 5-HT 1 µM, UK 14304 1 µM) jeweils in Anwesenheit von 100 nM oder 100 µM Forskolin bestimmt. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines repräsentativen Experiments, das in Dreifachbestimmungen durchgeführt wurde. \*\*,  $p < 0.01$  (ANOVA und *Dunnett's Multiple Comparison-Test*).

### 3.3. Einfluss der Lysophospholipide auf das Zellwachstum

Viele Studien belegen einen Einfluss von Lysophospholipiden auf Zellmotilität und Zellwachstum. Beide Vorgänge sind zum Beispiel bei Organogenese und Wundheilung essentiell. Hemmung bzw. auch Stimulation von Zellwachstum im Sinne einer Zellvermehrung und auch Induktion von Apoptose haben wichtige physiologische und pathophysiologische Funktionen im Organismus. Unter der Anwesenheit der Lysophospholipide im Wachstumsmedium der Zellen wurde ihr Einfluss auf die Zellproliferation bei *Opossum kidney*-Zellen untersucht. Als Indikator für eine Zellvermehrung wurde mittels Kristallviolettgefärbung und Thymidineinbau indirekt der DNA-Gehalt der Zellen bestimmt. Wie in Abb. 7 dargestellt, hatte S1P im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum. SPC übte einen hemmenden Effekt auf die Zellproliferation aus. Gegenüber der Kontrolle war die Absorption kristallviolettgefärbter Zellen nach zweitägiger bzw. dreitägiger Inkubation mit 5  $\mu$ M SPC um ca. 80 % vermindert.

Der Hemmeffekt von SPC war konzentrationsabhängig. Während SPC-Konzentrationen von mehr als 5  $\mu$ M das Zellwachstum signifikant hemmten, waren SPC-Konzentrationen bis zu 1  $\mu$ M unwirksam (Abb. 8 und 9).

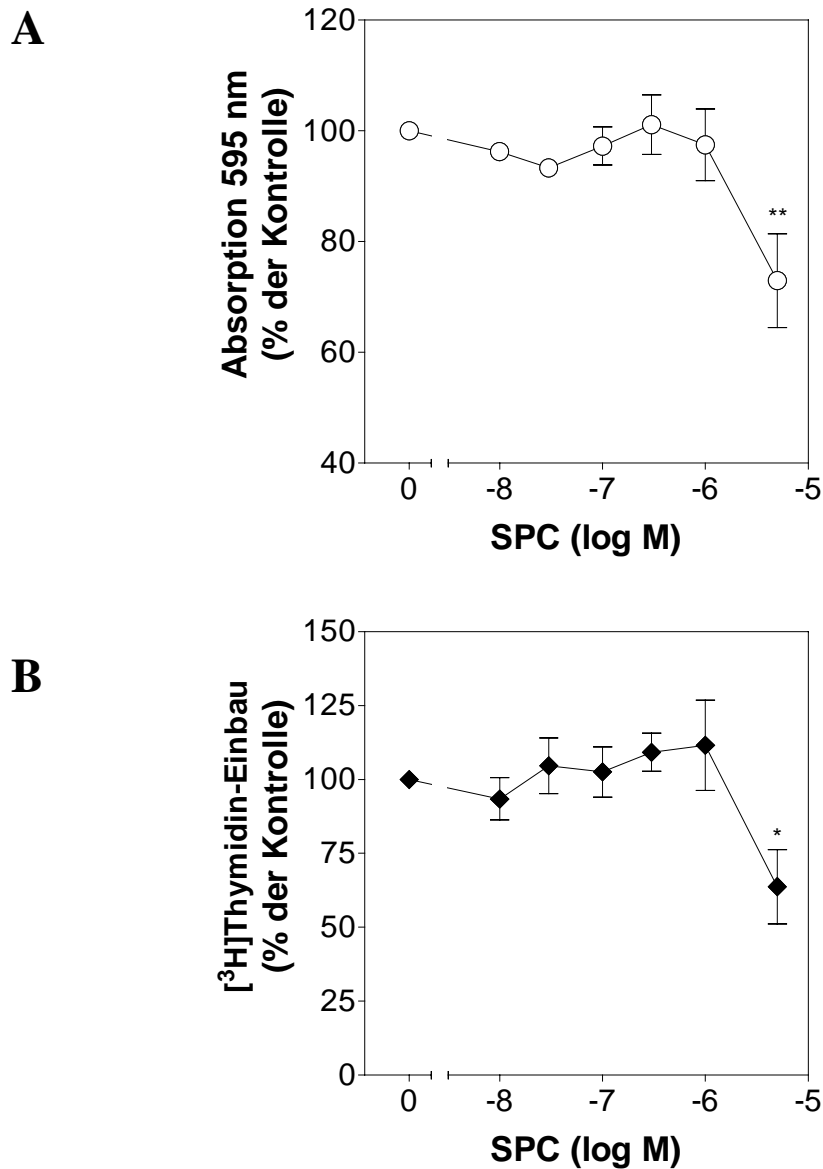
Die wachstumshemmende Wirkung von SPC wurde durch PTX nicht aufgehoben (Abb. 9). Während PTX selbst in einigen Versuchen das Zellwachstum hemmte (Abb. 9A), war der Hemmeffekt von SPC in den mit PTX vorbehandelten Zellen etwas stärker ausgeprägt als in den Kontrollzellen (Abb. 9B). Diese Ergebnisse sprechen gegen eine wesentliche Beteiligung von  $G_i$ -Proteinen an der Hemmung des Zellwachstums durch SPC. Die Inkubation der Zellen mit FKS diente als Positivkontrolle, da FKS neben unterschiedlichen Lysophospholipiden auch diverse Wachstumsfaktoren enthält und eine Stimulation des Zellwachstums bewirkt. LPA übte auf die Zellen einen wachstumsfördernden Einfluss aus, der etwas geringer war als die Wirkung von FKS (Abb. 7).



**Abbildung 7: Einfluss von LPA, S1P und SPC auf das Wachstum von *Opossum kidney*-Zellen**

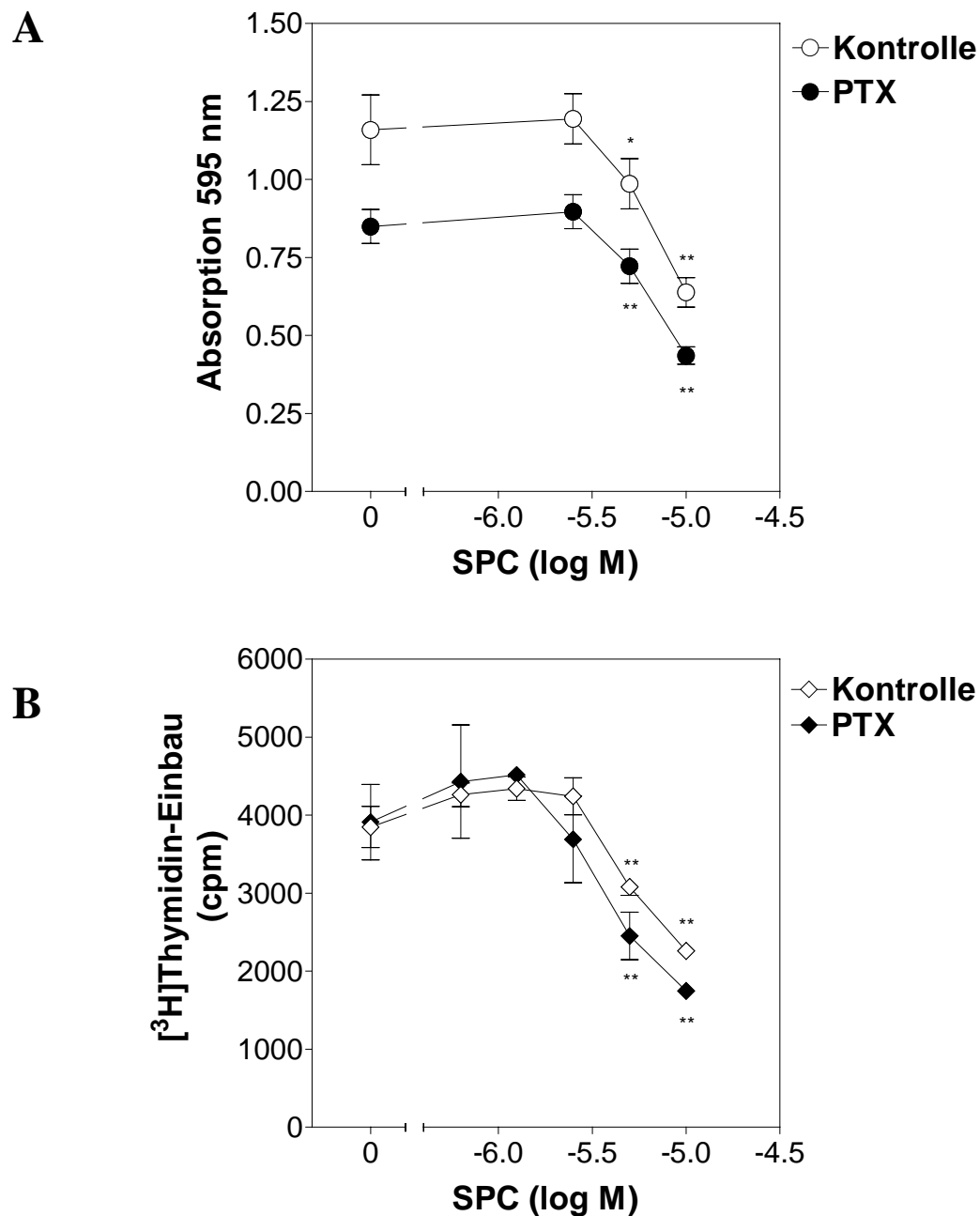
Die Zellen wurden für 2 bzw. 3 Tage mit den angegebenen Agonisten inkubiert. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Im Anschluss wurde nach Kristallviolett-Färbung die Absorption im Spektrofluorometer gemessen. Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SD eines repräsentativen Experiments, das in Dreifachbestimmungen durchgeführt wurde. \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  (ANOVA und *Dunnett's Multiple Comparison-Test*).





**Abbildung 8: Konzentrationsabhängigkeit der Hemmung des Zellwachstums durch SPC**

Die Zellen wurden für 2 Tage mit den angegebenen SPC-Konzentrationen inkubiert. Anschliessend wurde das Zellwachstum durch Kristallviolett-Färbung (A) oder Messung des [<sup>3</sup>H]Thymidin-Einbaus (B) bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei Experimenten. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$  (ANOVA und *Dunnnett's Multiple Comparison-Test*).



**Abbildung 9: Einfluss von PTX auf die Hemmung des Zellwachstums durch SPC**

Kontrollzellen und PTX-behandelte Zellen wurden für 2 Tage mit den angegebenen SPC-Konzentrationen inkubiert. Anschliessend wurde das Zellwachstum durch Kristallviolett-Färbung (A) oder Messung des  $[^3\text{H}]$ Thymidin-Einbaus (B) bestimmt. Die Ergebnisse (Mittelwerte  $\pm$  SD) stammen aus einem repräsentativen Experiment, das in Dreifachbestimmungen durchgeführt wurde. \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; signifikante Hemmung des Zellwachstums durch SPC (ANOVA und *Dunnett's Multiple Comparison*-Test).

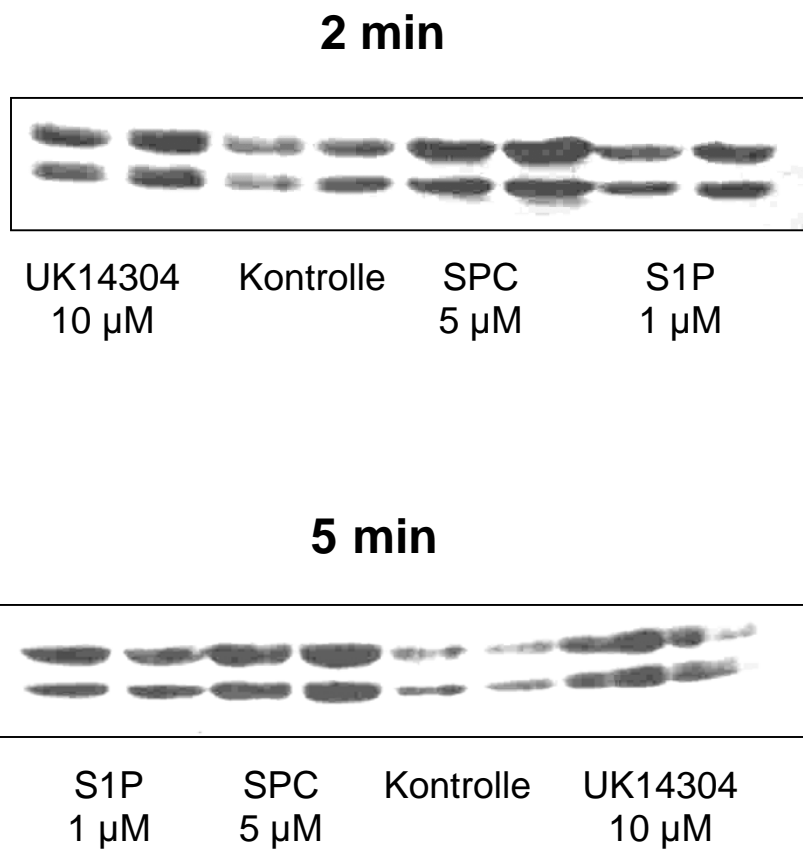
### 3.4. Aktivierung von MAP-Kinasen durch Lysophospholipide

Da für die Regulation des Zellwachstums die MAP-Kinasen eine wichtige Rolle spielen (siehe zum Beispiel Gutkind, 2000; Pearson *et al.*, 2001; Johnson und Lapadat, 2002), wurde schliesslich untersucht, ob die Lysophospholipide S1P, SPC und LPA in *Opossum kidney*-Zellen die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2, p38 und JNK/SAPK aktivierten. Dies wurde im Western-Blot mit Phospho-spezifischen Antikörpern untersucht.

Sowohl S1P als auch SPC stimulierten in *Opossum kidney*-Zellen die Phosphorylierung von ERK1 und ERK2 (Abb. 10), ebenso wie UK14304, welches als Positivkontrolle fungierte. Die Stimulation war bereits nach 2 Minuten erkennbar, jedoch nach 5 Minuten deutlicher ausgeprägt (Abb. 10). Auch LPA stimulierte die ERK-Phosphorylierung (Abb. 12). Nach Vorbehandlung mit PTX war die Stimulation der ERK-Phosphorylierung durch S1P, SPC und LPA deutlich abgeschwächt (Abb. 11 und 12).

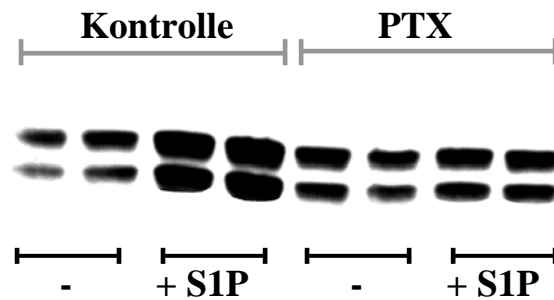
Auch die Phosphorylierung der MAP-Kinasen p38 und JNK/SAPK wurde durch S1P und SPC stimuliert (Abb. 13 und 14). Hierbei war insbesondere die Stimulation durch SPC nach 2 Minuten bereits deutlich; nach 5 Minuten war sie allerdings, wie die Stimulation durch S1P, stärker ausgeprägt (Abb. 13 und 14).

Der mutmassliche SPC-Rezeptor OGR1 vermittelte in MCF10A-Zellen eine Hemmung des Zellwachstums durch SPC (Xu *et al.*, 2000). Diese OGR1-vermittelte Wachstumshemmung war von einer Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 abhängig, denn sie wurde durch den Inhibitor PD98059 aufgehoben (Xu *et al.*, 2000). PD98059 hemmt die ERK-Aktivierung durch Hemmung der in der MAP-Kinase-Kaskade oberhalb liegenden Kinase (Pearson *et al.*, 2001). Um zu untersuchen, welche Rolle die MAP-Kinasen bei der Hemmung des Zellwachstums durch SPC in *Opossum kidney*-Zellen spielen, wurde schliesslich der Einfluss von MAP-Kinase-Inhibitoren auf diesen Effekt untersucht. In Gegenwart von PD98059 war das Wachstum der *Opossum kidney*-Zellen verlangsamt (Abb. 15). Die Inkubation mit 10  $\mu$ M PD98059 führte zu einer Reduktion, aber nicht zur vollständigen Aufhebung des Hemmeffektes von SPC (Abb. 15). Dagegen hatte der p38-Inhibitor keine signifikante Auswirkung auf den von SPC verübten Effekt auf das Zellwachstum und beeinflusste auch nicht das basale Wachstum der Zellen (Abb. 16).



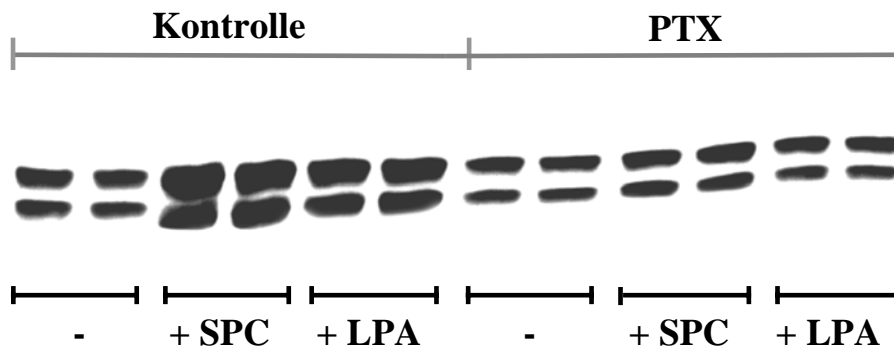
**Abbildung 10: Stimulation der Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 durch S1P und SPC**

Die Zellen wurden in Anwesenheit der angegebenen Agonisten für 2 min bzw. 5 min inkubiert. Nach Zellyse wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Die phosphorylierten MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 wurden mit einem spezifischen Phospho-p42/44 MAP-Kinase-Antikörper nachgewiesen.



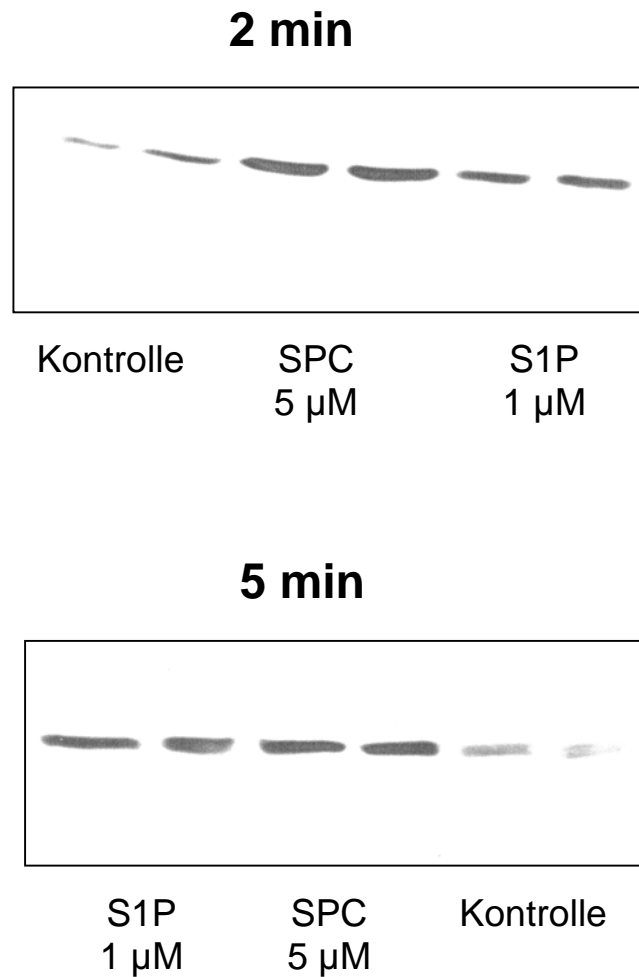
**Abbildung 11: Einfluss von PTX auf die durch S1P induzierte ERK-Phosphorylierung**

Mit PTX vorbehandelte Zellen und Kontrollzellen wurden in Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) von S1P für 5 min inkubiert und die Proteine anschliessend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die phosphorylierten ERK1 und ERK2 wurden mit einem spezifischen Phospho-p42/44 MAP-Kinase-Antikörper nachgewiesen.



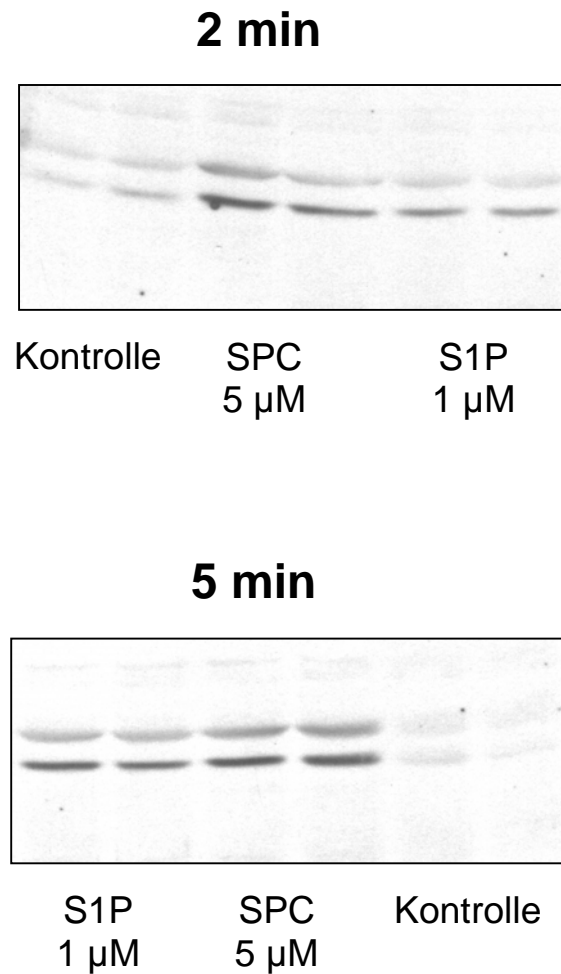
**Abbildung 12: Einfluss von PTX auf die durch SPC und LPA induzierte ERK-Phosphorylierung**

Mit PTX vorbehandelte Zellen und Kontrollzellen wurden in Anwesenheit (+) und Abwesenheit (-) der angegebenen Agonisten für 5 min inkubiert und die Proteine anschliessend mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die phosphorylierten ERK1 und ERK2 wurden mit einem spezifischen Phospho-p42/44 MAP-Kinase-Antikörper nachgewiesen.



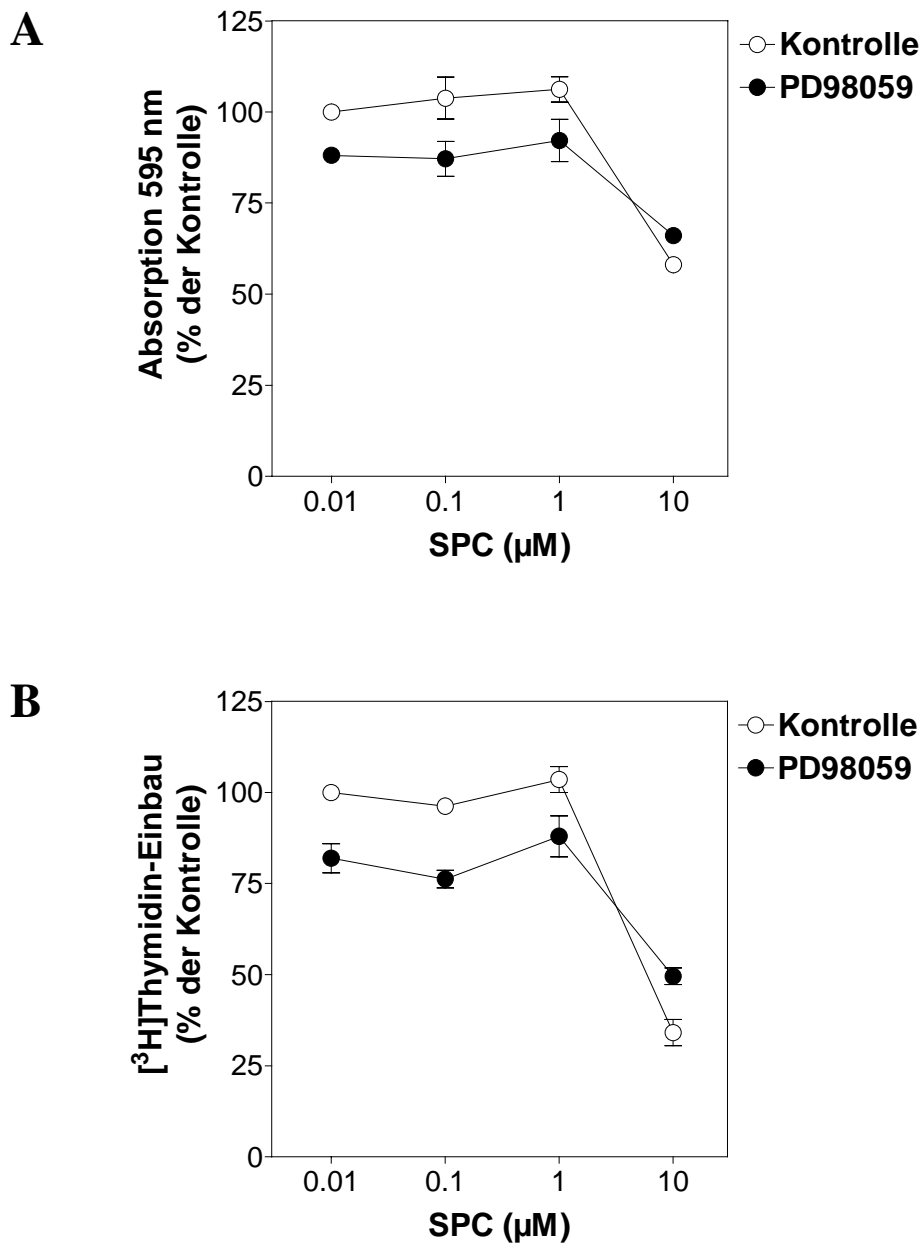
**Abbildung 13: Stimulation der Phosphorylierung der MAP-Kinase p38 durch S1P und SPC**

Die Zellen wurden in Anwesenheit der angegebenen Agonisten für 2 min bzw. 5 min inkubiert. Nach Zellyse wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Die phosphorylierte MAP-Kinase p38 wurde mit einem spezifischen Phospho-p38 MAP-Kinase-Antikörper nachgewiesen.



**Abbildung 14: Stimulation der Phosphorylierung von JNK/SAPK durch S1P und SPC**

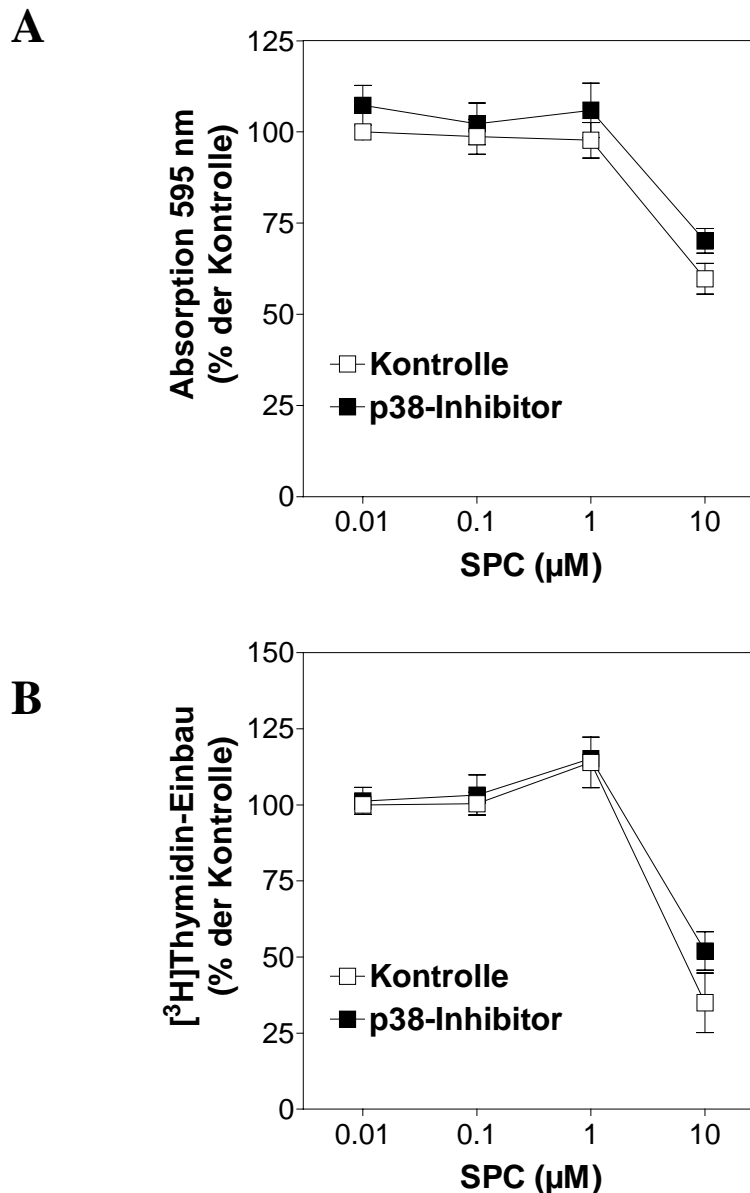
Die Zellen wurden in Anwesenheit der angegebenen Agonisten für 2 min bzw. 5 min inkubiert. Nach Zellyse wurden die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulose übertragen. Die phosphorylierten MAP-Kinasen JNK/SAPK wurde mit spezifischen Phospho-JNK/SAPK MAP-Kinase-Antikörper nachgewiesen.



**Abbildung 15: Einfluss von PD98059 auf die Hemmung des Zellwachstums durch SPC**

Die Zellen wurden für 1 h mit oder ohne PD98059 (10 µM) vorbehandelt, und dann für 2 Tage in An- und Abwesenheit von PD98059 (10 µM) mit SPC in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Bestimmung des Zellwachstums erfolgte anschliessend per Kristallviolett-Färbemethode (A) oder durch Bestimmung des [³H]Thymidineinbaus (B). Die Ergebnisse sind Mittelwerte ± SEM aus vier Experimenten.





**Abbildung 16: Einfluss des p38-Inhibitors auf die Hemmung des Zellwachstums durch SPC**

Die Zellen wurden für 1 h mit oder ohne p38-Inhibitor (1  $\mu\text{M}$ ) vorbehandelt, und dann für 2 Tage in An- und Abwesenheit von p38-Inhibitor (1  $\mu\text{M}$ ) mit SPC in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Die Bestimmung des Zellwachstums erfolgte per Kristallviolett-Färbemethode (A) oder durch Bestimmung des  $[^3\text{H}]$ Thymidineinbaus (B). Die Ergebnisse sind Mittelwerte  $\pm$  SEM aus drei Experimenten.

## 4. Diskussion

Stimulation von *Opossum kidney*-Zellen mit den Lysophospholipiden S1P und SPC führte zu raschen, transienten Anstiegen der  $[Ca^{2+}]_i$ , zur Hemmung der cAMP-Bildung, sowie zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 und ERK2, p38 und JNK/SAPK. Während S1P keinen wesentlichen Einfluss auf das Wachstum der Zellen hatte, führte SPC zur Abnahme der Zellzahl. LPA induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege, aktivierte ERK1 und ERK2 und stimulierte das Zellwachstum.

Die durch S1P und SPC verursachten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege wurden durch PTX gehemmt und wurden folglich durch  $G_i$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt. Alle S1P-Rezeptoren der EDG-Familie koppeln unter anderem an  $G_i$ -Proteine (siehe Ishii *et al.*, 2004). Von den ubiquitär exprimierten S1P-EDG-Rezeptoren S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub> vermitteln insbesondere S1P<sub>2</sub> und S1P<sub>3</sub>  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege (zur Übersicht siehe Meyer zu Heringdorf, 2004). Auch die kürzlich als S1P-Rezeptoren beschriebenen Rezeptoren GPR3, GPR6 und GPR12 können PTX-sensitive  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege vermitteln (Uhlenbrock *et al.*, 2002). Gegenwärtig bleibt unklar, welcher bzw. welche dieser Rezeptoren die  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch S1P in *Opossum kidney*-Zellen vermitteln. SPC ist ein niedrig affiner Agonist an S1P-Rezeptoren (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2002; Ishii *et al.*, 2004), so dass die durch SPC ausgelösten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch S1P-Rezeptoren vermittelt sein könnten. Ausserdem ist SPC ein hochaffiner Agonist am OGR1-Rezeptor, der PTX-sensitive  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch SPC in MCF10A-Zellen vermittelte (Xu *et al.*, 2000). Die  $EC_{50}$  der durch SPC induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege betrug in OGR1-exprimierenden MCF10A-Zellen etwa 35 nM (Xu *et al.*, 2000). Während die Rezeptoren GPR4 und G2A als Rezeptoren für SPC und Lysophosphatidylcholin gegenwärtig umstritten sind (siehe Einleitung), wurde als weiterer möglicher SPC-Rezeptor der GPR12-Rezeptor beschrieben (Ignatov *et al.*, 2003a). Wenn dieser Rezeptor mit einem Signalpeptid für eine verbesserte Plasmamembran-Insertion fusioniert und mit der G-Protein-Untereinheit  $G\alpha_{16}$  coexprimiert wurde, vermittelte er  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch SPC mit einer  $EC_{50}$  von etwa 66 nM (Ignatov *et al.*, 2003a). Andere Autoren beobachteten allerdings, dass eine Überexpression des GPR12-Rezeptors in HEK-293-Zellen die  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch SPC nicht verstärkte (Uhlenbrock *et al.*, 2002). In *Opossum kidney*-Zellen induzierten S1P und SPC  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege mit einer  $EC_{50}$  von jeweils 50 nM und 390 nM; SPC war also ungefähr zehnmal weniger potent als S1P. Dies spricht gegen eine Vermittlung der SPC-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch OGR1 oder GPR12, ist jedoch charakteristisch für S1P-Rezeptoren der

EDG-Familie, an denen S1P gewöhnlich potenter als SPC ist (Meyer zu Heringdorf *et al.*, 2002).

Die LPA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege wurden durch PTX nur etwa zur Hälfte gehemmt, was dafür spricht, dass sie sowohl durch  $G_i$  als auch durch PTX-insensitive G-Proteine vermittelt wurden. Alle vier bisher bekannten LPA-Rezeptoren,  $LPA_{1-4}$ , sind in der Lage,  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege zu vermitteln (Ishii *et al.*, 2004), und es bleibt gegenwärtig unklar, welcher bzw. welche dieser Rezeptoren die  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege durch LPA in *Opossum kidney*-Zellen vermitteln. Die  $EC_{50}$  der LPA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in *Opossum kidney*-Zellen betrug etwa 20 nM. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Dixon und Mitarbeitern, die LPA-induzierte  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege in *Opossum kidney*-Zellen beschrieben haben, welche eine  $EC_{50}$  von 2,6  $\mu M$  aufwiesen und vollständig PTX-insensitiv waren (Dixon *et al.*, 1999). Die von Dixon und Mitarbeitern festgestellte  $EC_{50}$  liegt allerdings weit über derjenigen, die üblicherweise an LPA-EDG-Rezeptoren gefunden wird. Die  $EC_{50}$  der LPA-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege war in den hier gemachten Untersuchungen eher in einem für LPA/EDG-Rezeptoren zu erwartenden Bereich.

*Opossum kidney*-Zellen sind eine gut charakterisierte Zelllinie, die bekanntermassen Serotoninrezeptoren vom Subtyp  $5HT_{1B}$  und  $\alpha_{2c}$ -Adrenorezeptoren exprimiert, die beide inhibitorisch an die Adenylylzyklase koppeln (Murphy und Bylund, 1989; Zgombick *et al.*, 1998). Entsprechend wurde die Forskolin-stimulierte cAMP-Bildung durch Serotonin und den spezifischen  $\alpha_2$ -Agonisten UK14304 gehemmt. Auch S1P und SPC hemmten in *Opossum kidney*-Zellen die durch 100  $\mu M$  Forskolin stimulierte cAMP-Produktion, während sie keinen Einfluss auf die durch 0,1  $\mu M$  Forskolin schwach stimulierte cAMP-Produktion hatten. Dies Ergebnis legt nahe, dass die Rezeptoren, über die die beiden Lysophospholipide wirken, überwiegend inhibitorisch an die Adenylylzyklase koppeln. Eine Hemmung der Forskolin-stimulierten cAMP-Produktion durch S1P wurde zuvor bereits in verschiedenen Zelltypen beobachtet und mit der Expression des  $S1P_1$ -Rezeptors korreliert (Zondag *et al.*, 1998). Von den drei ubiquitär exprimierten S1P-EDG-Rezeptoren scheint insbesondere der  $S1P_1$ -Rezeptor eine Hemmung der Adenylylzyklase zu vermitteln, während  $S1P_2$  und  $S1P_3$  in Abwesenheit von Forskolin die cAMP-Bildung stimulierten (Kon *et al.*, 1999; Ishii *et al.*, 2004). Die Wirkung von S1P auf die cAMP-Bildung in *Opossum kidney*-Zellen stimmt also eher mit der Wirkung des  $S1P_1$ -Rezeptors als mit der Wirkung von  $S1P_2$  oder  $S1P_3$  überein. Auch eine Wirkung über GPR3, GPR6 oder GPR12 erscheint unwahrscheinlich, da diese Rezeptoren Liganden-unabhängig eine Stimulation der cAMP-Bildung induzierten, was durch S1P leicht verstärkt wurde (Uhlenbrock *et al.*, 2002).

LPA hatte auf die Zellproliferation einen fördernden Effekt, während S1P das Zellwachstum nicht signifikant beeinflusste. SPC erwies sich als stark wachstumshemmend. Ursprünglich war SPC in verschiedenen Zelltypen als Mitogen entdeckt worden (Desai und Spiegel, 1991). In den hier gemachten Untersuchungen bewirkte SPC in den untersuchten Konzentrationen jedoch eine deutliche Hemmung der Proliferation, nachgewiesen durch [ $^3\text{H}$ ]Thymidin-Einbau und Kristallviolett-färbung der DNA. Xu *et al.* (2000) zeigten bei mehreren verschiedenen Tumorzelllinien, die den mutmasslichen SPC-Rezeptor OGR1 exprimierten, eine Hemmung des Zellwachstums durch SPC (Xu *et al.*, 2000). In OGR1-exprimierenden MCF10A-Zellen aktivierte SPC ausserdem die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2, und eine Hemmung der ERK-Aktivierung durch PD98059 führte zur Aufhebung der Wachstumshemmung durch SPC (Xu *et al.*, 2000). Die Hemmung des Zellwachstums durch SPC war sowohl in OGR1-exprimierenden MCF10A-Zellen als auch in *Opossum kidney*-Zellen insensitiv gegenüber PTX. In *Opossum kidney*-Zellen wurde jedoch die SPC-induzierte ERK-Aktivierung durch PTX gehemmt, während diese Wirkung in OGR1-exprimierenden MCF10A-Zellen PTX-insensitiv war (Xu *et al.*, 2000). In *Opossum kidney*-Zellen wurde ausserdem die Hemmung des Zellwachstums durch PD98059 nur geringfügig vermindert, während PD98059 die Hemmwirkung von SPC in MCF10A-Zellen vollständig aufzuheben vermochte (Xu *et al.*, 2000), was allerdings auch an den unterschiedlichen PD98059-Konzentrationen liegen könnte (10  $\mu\text{M}$  in *Opossum kidney*-Zellen im Vergleich zu 30  $\mu\text{M}$  in MCF10A-Zellen). Andererseits ist es unwahrscheinlich, dass die Hemmung des Zellwachstums in *Opossum kidney*-Zellen durch ERK1 und ERK2 vermittelt wird, denn ersteres war PTX-insensitiv und letzteres PTX-sensitiv. Für die Vermittlung der Wachstumshemmung kommt eher die MAP-Kinase JNK/SAPK infrage, die beispielsweise an der Vermittlung der Apoptose nach UV-Bestrahlung beteiligt ist (Tournier *et al.*, 2000). Es bleibt jedoch gegenwärtig unklar, ob SPC in *Opossum kidney*-Zellen Apoptose auslöst, und durch welche Rezeptoren und Signaltransduktionswege dies vermittelt wird.

Eine Stimulation des Wachstums von *Opossum kidney*-Zellen durch LPA wurde bereits von Dixon *et al.* beschrieben (Dixon *et al.*, 1999). Ähnlich wie die LPA-induzierten  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Anstiege, die durch Dixon *et al.* beobachtet worden waren (siehe oben), wurde auch die Stimulation des Wachstums von diesen Autoren nur durch LPA-Konzentrationen von 10-100  $\mu\text{M}$  erreicht (Dixon *et al.*, 1999). Dagegen wurde in der hier vorliegenden Arbeit eine effektive Stimulation des Wachstums bereits durch 1  $\mu\text{M}$  LPA beobachtet.

Die Lysophospholipide S1P, SPC und LPA werden im Blut teilweise an Albumin gebunden transportiert (Okajima, 2002; Moolenaar *et al.*, 2004). Da ein Teil des Plasma-Albumins

glomerulär filtriert und von den proximalen Nierentubuluszellen rückresorbiert wird (zur Übersicht siehe Gekle, 2005), kommen diese Zellen natürlicherweise mit Lysophospholipiden in Kontakt. Bei Nierenerkrankungen, bei denen die glomeruläre Proteinfiltration pathologisch erhöht ist, werden vermutlich die Lysophospholipide in erhöhtem Ausmass auf das Nierentubulusepithel einwirken. Dies könnte verschiedene Auswirkungen haben. In MPT-Zellen (*mouse renal proximal tubular cells*) hemmte LPA die Apoptose nach Entfernung von Wachstumsmediatoren aus dem Zellmedium; ausserdem fungierte es für diese Zelllinie als Mitogen, was auf eine mögliche Rolle bei der Rekonvaleszenz nach tubulärem Schaden hinweisen könnte (Levine *et al.*, 1997). SPC wiederum könnte einen schädlichen Einfluss auf das Nierentubulusepithel haben. Zukünftigen Untersuchungen bleibt es vorbehalten, die jeweilige physiologische und pathophysiologische Rolle der Lysophospholipide in der Niere zu klären.

## 5. Zusammenfassung

Obwohl die Lysophospholipide Sphingosin-1-phosphat (S1P) und Sphingosylphosphorylcholin (SPC) einen Einfluss auf die Nierenfunktion der narkotisierten Ratte haben, ist wenig über ihre Wirkung an isolierten Nierenzellen bekannt. Hier wurden die Wirkungen von S1P, SPC und Lysophosphatidsäure (LPA) auf unterschiedliche Zellfunktionen in *Opossum kidney*-Zellen, welche ein Modell für proximale Nierentubuluszellen darstellen, untersucht. S1P ( $EC_{50}$   $50 \pm 20$  nM), SPC ( $EC_{50}$   $390 \pm 50$  nM) und LPA ( $EC_{50}$   $20 \pm 6$  nM) induzierten rasche, transiente Anstiege der  $[Ca^{2+}]_i$  in *Opossum kidney*-Zellen. Während die Effekte von S1P und SPC Pertussistoxin (PTX)-sensitiv und somit durch  $G_i$ -Proteine vermittelt waren, wurden die durch LPA ausgelösten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege nur um 40-50 % durch PTX gehemmt, was die Beteiligung PTX-insensitiver G-Proteine, wahrscheinlich der  $G_q$ -Familie, nahe legt. Die Konzentrationsabhängigkeit der Lysophospholipid-induzierten  $[Ca^{2+}]_i$ -Anstiege entspricht der Konzentrationsabhängigkeit verschiedener, durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der EDG-Familie vermittelter Wirkungen. S1P und insbesondere SPC hemmten die durch Forskolin stimulierte cAMP-Produktion, was eine typische Wirkung von  $G_i$ -gekoppelten Rezeptoren ist. SPC war dabei ähnlich wirksam wie Serotonin oder der  $\alpha_2$ -Adrenozeptor-Agonist UK14304. Das Wachstum der *Opossum-kidney*-Zellen wurde durch LPA stimuliert, während S1P keine signifikante Wirkung hatte. SPC dagegen hemmte in Konzentrationen von 5-10  $\mu$ M das Wachstum der Zellen. Die Hemmung des Zellwachstums durch SPC war insensitive gegenüber PTX. S1P, SPC und LPA aktivierten PTX-sensitiv die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) ERK1 und ERK2. S1P und SPC aktivierten ausserdem die MAP-Kinasen p38 und JNK/SAPK. Ein Inhibitor der p38-MAP-Kinase hatte keinen, und ein Inhibitor der ERK-Aktivierung hatte einen geringen Einfluss auf die Hemmung des Zellwachstums durch SPC. Offensichtlich wirken S1P und SPC, zumindest in Hinsicht auf das Zellwachstum, an *Opossum kidney*-Zellen auf verschiedene Rezeptoren, da beide die untersuchten MAP-Kinasen aktivierten, aber nur SPC das Zellwachstum hemmte. Die Identifizierung der Lysophospholipid-Rezeptoren, die die Wirkungen von LPA, S1P und SPC an *Opossum kidney*-Zellen vermitteln, bleibt zukünftigen Untersuchungen vorbehalten. Die hier gemachten Beobachtungen weisen auf eine mögliche physiologische und/oder pathophysiologische Rolle von S1P, SPC und LPA für das Nierentubulusepithel hin, da die Lysophospholipide an Plasmaalbumin binden, welches zum Teil glomerulär filtriert und von proximalen Tubuluszellen rückresorbiert wird.

## 6. Literaturverzeichnis

- 1) Aoki, J. (2004): Mechanisms of lysophosphatidic acid production. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15, 477-489.
  
- 2) Bektas, M., Barak, L. S., Jolly, P. S., Liu, H., Lynch, K. R., Lacana, E., Suhr, K. B., Milstien, S., Spiegel, S. (2003): The G-protein-coupled receptor GPR4 supresses ERK activation in a ligand-independent manner. *Biochemistry* 42, 12181-12191.
  
- 3) Bischoff, A., Czyborra, P., Fetscher, C., Meyer zu Heringdorf, D., Jakobs, K. H. & Michel, M. C. (2000a): Sphingosine-1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine constrict renal and mesenteric microvessels in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1871-1877.
  
- 4) Bischoff, A., Czyborra, P., Fetscher, C., Meyer zu Heringdorf, D., Jakobs, K. H. & Michel, M. C. (2000b): Sphingosine-1-phosphate reduces rat renal and mesenteric blood flow in vivo in a pertussis toxin-sensitive manner. *Br. J. Pharmacol.* 130, 1878-1883.
  
- 5) Bischoff, A., Meyer zu Heringdorf, D., Jakobs, K. H. & Michel, M. C. (2001): Lysosphingolipid receptor-mediated diuresis and natriuresis in anaesthetized rats. *Br. J. Pharmacol.* 132, 1925-1933.
  
- 6) Brinkmann, V., Davis, M. D., Heise, C. E., Albert, R., Cottens, S., Hof, R., Bruns, C., Prieschl, E., Baumruker, T., Hiestand, P., Foster, C. A., Zollinger, M., Lynch, K. R. (2002): The immune modulator FTY720 targets sphingosine 1-phosphate receptors. *J. Biol. Chem.* 14, 21453-21457.
  
- 7) Chun, J., Goetzl, E. J., Hla, T., Igarashi, Y., Lynch, K. R., Moolenaar, W., Pyne, S., Tigyi, G. (2002): International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* 54, 265-269.
  
- 8) Clair, T., Aoki, J., Koh, E., Bandle, R. W., Nam, S. W., Ptaszynska, M. M., Mills, G. B., Schiffmann, E., Liotta, L. A., Stracke, M. L. (2003): Autotaxin hydrolyzes sphingosylphosphorylcholine to produce the regulator of migration, sphingosine-1-phosphate. *Cancer Res.* 63, 5446-5453.

- 9) Desai, N. N., Spiegel, S. (1991): Sphingosylphosphorylcholine is a remarkably potent mitogen for a variety of cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 181, 361-366.
- 10) Dixon, R. J., Young, K., Brunskill, N. J. (1999): Lysophosphatidic acid-induced calcium mobilization and proliferation in kidney proximal tubular cells. *Am. J. Physiol.* 276, 191-198.
- 11) Fukushima, N., Ishii, I., Contos, J. J., Weiner, J. A., Chun, J. (2001): Lysophospholipid receptors. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 41, 507-534.
- 12) Gekle, M. (2005): Renal tubule albumin transport. *Annu. Rev. Physiol.* 67, 573-594.
- 13) Graeler, M. H., Goetzl, E. J. (2004): The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* 18, 551-553.
- 14) Grynkiewicz, G., Poenie, M., Tsien, R. Y. (1985): A new generation of  $\text{Ca}^{2+}$  indicators with greatly improved fluorescence properties. *J. Biol. Chem.* 260, 3440-3450.
- 15) Gutkind, J. S. (2000): Regulation of mitogen-activated protein kinase signaling networks by G protein-coupled receptors. *Science's STKE* 40, re1.
- 16) Hla, T., Lee, M., Ancellin, N., Liu, C. H., Thangada, S., Thompson, B. D., Kluk, M. (1999): Sphingosine-1-phosphate: extracellular mediator or intracellular second messenger? *Biochem. Pharmacol.* 58, 201-207.
- 17) Hla, T. (2003): Signaling and biological actions of sphingosine 1-phosphate. *Pharmacol. Res.* 47, 401-407.
- 18) Ignatov, A, Lintzel, J., Hermans-Borgmeyer, I., Kreienkamp, H. J., Joost, P., Thomsen, S., Methner, A., Schaller, H. C. (2003a): Role of the G-protein-coupled receptor GPR12 as high-affinity receptor for sphingosylphosphorylcholine and its expression and function in brain development. *Neuroscience* 23, 907-914.



- 19) Ignatov, A, Lintzel, J, Kreienkamp, H. J, Schaller, H. C. (2003b): Sphingosine-1-phosphate is a high-affinity ligand for the G protein-coupled receptor GPR6 from mouse and induces intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  release by activating the sphingosine-kinase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 311, 329-336.
  
- 20) Ishii, I., Ye, X., Friedman, B., Kawamura, S., Contos, J. J., Kingsbury, M. A., Yang, A. H., Zhang, G., Brown, J. H., Chun, J. (2002): Marked perinatal lethality and cellular signalling deficits in mice null for the two sphingosine 1-phosphate (S1P) receptors, S1P<sub>2</sub>/LP<sub>B2</sub>/EDG-5 and S1P<sub>3</sub>/LP<sub>B3</sub>/EDG-3. *J. Biol. Chem.* 277, 25152-25159.
  
- 21) Ishii, I., Fukushima, N., Ye, X., Chun, J. (2004): Lysophospholipid receptors: signaling and biology. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 321-354.
  
- 22) Johnson, G. L., Lapadat, R. (2002): Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science* 298, 1911-1912
  
- 23) Kabarowski, J. H., Zhu, K., Le, L. Q., Witte, O. N., Xu, Y. (2001): Lysophosphatidylcholine as a ligand for the immunoregulatory receptor G2A. *Science* 293, 702-705.
  
- 24) Kon, J., Sato, K., Watanabe, T., Tomura, H., Kuwabara, A., Kimura, T., Tamama, K., Ishizuka, T., Murata, N., Kanda, T., Kobayashi, I., Ohta, H., Ui, M., Okajima, F. (1999): Comparison of intrinsic activities of the putative sphingosine 1-phosphate receptor subtypes to regulate several signalling pathways in their cDNA-transfected Chinese hamster ovary cells. *J. Biol. Chem.* 274, 23940-23947.
  
- 25) Koyama, H., Goodpasture, C., Miller, M. M., Teplitz, R. L., Riggs, A. D. (1978): Establishment and characterization of a cell line from the American opossum (*Didelphys virginiana*). *In Vitro* 14, 239-246.
  
- 26) Kribben, A., Herget-Rosenthal, S., Lange, B., Erdbrügger, W., Philipp, T., Michel, M. C. (1997):  $\alpha_2$ -Adrenoceptors in *Opossum kidney* cells couple to stimulation of mitogen-activated protein kinase independently of adenylyl cyclase inhibition. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 356, 225-232.

- 27) Kupperman, E., An, S., Osborne, N., Waldron, S., Stainier, D. Y. R. (2000): A sphingosine-1-phosphate receptor regulates cell migration during vertebrate heart development. *Nature* 406, 192-195.
  
- 28) Levine, J. S., Koh, J. S., Triaca, V., Lieberthal, W. (1997): Lysophosphatidic acid: a novel growth and survival factor for renal proximal tubular cells. *Am. J. Physiol.* 273, 575-585.
  
- 29) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
  
- 30) Lynch, K. R., Im, D. S. (1999): Life on the edge. *Trends Pharmacol. Sci.* 20, 473-475.
  
- 31) Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G. J., Card, D., Keohane, C., Rosenbach, M., Hale, J., Lynch, C. L., Rupprecht, K., Parsons, W., Rosen, H. (2002): Alteration of lymphocyte trafficking by sphingosine-1-phosphate receptor agonists. *Science* 296, 346-349.
  
- 32) Matloubian, M., Lo, C. G., Cinamon, G., Lesneski, M. J., Xu, Y., Brinkmann, V., Allende, M. L., Proia, R. L., Cyster, J. G. (2004): Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 427, 355-360.
  
- 33) Meyer zu Heringdorf, D., Himmel, H. M., Jakobs, K. H. (2002): Sphingosylphosphorylcholine - biological functions and mechanisms of action. *Biochim. Biophys. Acta* 1682, 48-55.
  
- 34) Meyer zu Heringdorf, D.: Lysophospholipids. In: Offermanns, S., Rosenthal, W. (Eds.) *Encyclopedic Reference of Molecular Pharmacology*. Springer-Verlag Heidelberg, 2003, pp 566-571.
  
- 35) Meyer zu Heringdorf, D. (2004): Lysophospholipid receptor-dependent and –independent calcium signaling. *J. Cell. Biochem.* 92, 937-948.
  
- 36) Mills, G. B., Moolenaar, W. H. (2003): The emerging role of lysophosphatidic acid in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3, 582-591.

- 37) Moolenaar, W. H., Kranenburg, O., Postma, F. R., Zondag, C. M. (1997): Lysophosphatidic acid: G protein signalling and cellular responses. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 168-173.
  
- 38) Moolenaar, W. H. (1999): Bioactive lysophospholipids and their G protein-coupled receptors. *Exp. Cell Res.* 253, 230-238.
  
- 39) Moolenaar, W. H., van Meeteren, L. A., Giepmans, B. N. (2004): The ins and outs of lysophosphatidic acid signaling. *Bioessays* 26, 870-881.
  
- 40) Murakami, N., Yokomizo, T., Okuno, T., Shimizu, T. (2004): G2A is a proton-sensing G-protein-coupled receptor antagonized by lysophosphatidylcholine. *J. Biol. Chem.* 279, 42484-42491.
  
- 41) Murphy, T. J., Bylund, D. B. (1989): Characterization of serotonin-1B receptors negatively coupled to adenylate cyclase in OK cells, a renal epithelial cell line from the opossum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249, 535-543.
  
- 42) Okajima, F. (2002): Plasma lipoproteins behave as carriers of extracellular sphingosine 1-phosphate: is this an atherogenic mediator or an anti-atherogenic mediator? *Biochim. Biophys. Acta* 1582, 132-137.
  
- 43) Paik, J. H., Chae, Ss., Lee, M. J., Thangada, S., Hla, T. (2001): Sphingosine 1-phosphate-induced endothelial cell migration requires the expression of EDG-1 and EDG-3 receptors and Rho-dependent activation of  $\alpha_v\beta_3$ - and  $\beta_1$ -containing integrins. *J. Biol. Chem.* 13, 11830-11837.
  
- 44) Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B. E., Karandikar, M., Berman, K., Cobb, M. H. (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr. Rev.* 22, 153-183.
  
- 45) Pyne, S. und Pyne, N. J. (2000): Sphingosine 1-phosphate signalling in mammalian cells. *Biochem. J.* 349, 385-402.

- 46) Sanna, M. G., Liao, J., Jo, E., Alfonso, C., Ahn, M. Y., Peterson, M. S., Webb, B., Lefebvre, S., Chun, J., Gray, N., Rosen, H. (2004): Sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor subtypes S1P<sub>1</sub> and S1P<sub>3</sub>, respectively, regulate lymphocyte recirculation and heart rate. *J. Biol. Chem.* 279, 13839-13848.
  
- 47) Siehler, S., Manning, D. R. (2002): Pathways of transduction engaged by sphingosine 1-phosphate through G protein-coupled receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1582, 94-99.
  
- 48) Spiegel, S. und Milstien, S. (2000): Functions of a new family of sphingosine-1-phosphate receptors. *Biochim. Biophys. Acta* 1484, 107-116.
  
- 49) Spiegel, S. und Milstien, S. (2003): Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 397-407.
  
- 50) Taha, T. A., Agraves, K. M., Obeid, L. M. (2004) : Sphingosine-1-phosphate receptors : receptor specificity versus functional redundancy. *Biochim. Biophys. Acta* 1682, 48-55.
  
- 51) Tournier, C., Hess, P., Yang, D. D., Xu, J., Turner, T. K., Nimnual, A., Bar-Sagi, D., Jones, S. N., Flavell, R. A., Davis, R. J. (2000): Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome C-mediated death pathway. *Science* 288, 870-874.
  
- 52) Uhlenbrock, K., Gassenhuber, H., Kostenis, E. (2002): Sphingosine 1-phosphate is a ligand of the human gpr3, gpr6 and gpr 12 family of constitutively active G-protein-coupled receptors. *Cell. Signal.* 14, 941-953.
  
- 53) van Koppen, C. J., Meyer zu Heringdorf, M., Laser, K. T., Zhang, C., Jakobs, K. H., Bünemann, M., Pott, L. (1996): Activation of a high affinity G<sub>i</sub> protein-coupled plasma membrane receptor by sphingosine-1-phosphate. *J. Biol. Chem.* 271, 2082-2087.
  
- 54) Witte, O. N., Kabarowski, J. H., Xu, Y., Le, L. Q., Zhu, K. (2005): Retraction of: Kabarowski, J. H., Zhu, K., Le, L. Q., Witte, O. N., Xu, Y. *Science*. 2001 Jul 27;293(5530):702-5. *Science* 307, 206.

- 55) Xiao, Y. J., Schwartz, B., Washington, M., Kennedy, A., Webster, K., Belinson, J., Xu, Y. (2001): Electrospray ionization mass spectrometry analysis of lysophospholipids in human ascitic fluids: comparison of the lysophospholipid contents in malignant vs nonmalignant ascitic fluids. *Anal. Biochem.* 290, 302-313.
- 56) Xu, Y., Zhu, K., Hong, G., Wu, W., Baudhuin, L. M., Xiao, Y., Damron, D. S. (2000): Sphingosylphosphorylcholine is a ligand for ovarian cancer G-protein-coupled receptor 1. *Nat. Cell Biol.* 2, 261-267.
- 57) Yang, A. H., Ishii, I., Chun, J. (2002): In vivo roles of lysophospholipid receptors revealed by gene targeting studies in mice. *Biochim. Biophys. Acta* 23, 197-203.
- 58) Zgombick, J. M., Branchek, T. A. (1998): Native 5-HT<sub>1B</sub> receptors in OK cells display dual coupling to elevation of intracellular calcium concentrations and inhibition of adenylate cyclase. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharm.* 358, 503-508.
- 59) Zhu, K., Baudhuin, L. M., Hong, G., Williams, F. S., Cristina, K. L., Kabarowski, J. H., Witte, O. N., Xu, Y. (2001): Sphingosylphosphorylcholine and lysophosphatidylcholine are ligands for the G protein-coupled receptor GPR4. *J. Biol. Chem.* 276, 41325-41335.
- 60) Zondag, G. C., Postma, F. R., Etten, I. V., Verlaan, I., Moolenaar, W. H. (1998): Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1. *Biochem. J.* 330, 605-609.

## 7. Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumin</i> )
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre freie Calciumkonzentration
cpm	Zerfälle pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
EC <sub>50</sub>	Konzentration, bei der 50 % des maximalen Effektes erreicht werden
ECL®	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamin- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β-aminoethylether)- <i>N,N,N',N'</i> -tetraessigsäure
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
f. c.	Endkonzentration ( <i>final concentration</i> )
FKS	fetales Kälberserum
HBSS	Hank's balancierte Salzlösung ( <i>Hank's balanced salt solution</i> )
5-HT	5-Hydroxytryptamin
HEPES	<i>N</i> -(2-Hydroxyethyl)-piperazin- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
IBMX	Isobutylmethylxanthin
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinases</i>
LPA	Lysophosphatidsäure ( <i>lysophosphatidic acid</i> )
MAP-Kinasen	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PKA	Proteinkinase A
PTX	Pertussistoxin
SAPK	<i>stress-activated protein kinases</i>
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDS	Natriumlaurylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfate</i> )
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>standard error of the mean</i> )
S1P	Sphingosin-1-Phosphat

SPC	Sphingosylphosphorylcholin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung ( <i>tris buffered saline</i> )
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
v/v	Volumen pro Volumen ( <i>volume by volume</i> )
w/v	Gewicht pro Volumen ( <i>weight by volume</i> )

## 8. Lebenslauf

### Markus Lehmann

geboren am 15. Mai 1973 in Unna, wohnhaft in Kamen

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulische Ausbildung

1979-1983	Grundschule „In der Mark“ in Kamen
1983-1992	Hermann-Ehlers-Gesamtschule in Kamen (Abitur)

### Wehrdienst

Juli 1992-Juni 1993

### Berufsausbildung

1993-1994	Krankenpflegehelferausbildung im Evangelischen Krankenhaus „Hausemannstift“ in Dortmund
-----------	---

### Studium

1994-1997	Studium der vorklinischen Humanmedizin an der Ruhr-Universität Bochum
1997-2000	Studium der klinischen Humanmedizin an der Universität Duisburg-Essen
2000-2001	Praktisches Jahr an den Städtischen Kliniken Dortmund

### Berufliche Tätigkeit

2002-2003	Arzt im Praktikum, Abteilung für Innere Medizin, St. Barbara-Klinik Hamm-Heessen
seit 10/2003	Assistenzarzt, Abteilung für Innere Medizin, St. Barbara-Klinik Hamm-Heessen